



Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular

TESIS DOCTORAL

**MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PLASTICIDAD
SINÁPTICA DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL Y DE
LA CORTEZA ENTORRINAL Y EL GIRO DENTADO DEL
HIPOCAMPO DE RATÓN**

Presentada por: **IRENE MARTÍNEZ GALLEG**O

Director: Prof. Dr. **ANTONIO RODRÍGUEZ MORENO**

Marzo, 2023



Financiación:

Ayuda para la Formación de Profesorado Universitario (FPU 2018-2023) del Ministerio de Universidades.

Artículos:

Martínez-Gallego, I., Pérez-Rodríguez, M., Coatl-Cuaya, H., Flores, G. & Rodríguez-Moreno, A. (2022). Adenosine and astrocytes determine the developmental dynamics of spike timing-dependent plasticity in the somatosensory cortex. *J. Neurosci*, 42(31), 6038–6052.

Martínez-Gallego, I. & Rodríguez-Moreno, A. (2022). Adenosine and Astrocytes Control Critical Periods of Neural Plasticity. *The Neuroscientist*.

Martínez-Gallego, I., Rodríguez-Moreno, A. & Andrade-Talavera, Y. (2022). Role of Group I Metabotropic Glutamate Receptors in Spike Timing-Dependent Plasticity. *Int. J. Mol. Sci*, 23(14), 7807.

Resumen

Una de las propiedades más importantes del sistema nervioso es la plasticidad. Durante el desarrollo postnatal del sistema nervioso, existen períodos críticos de plasticidad sináptica en los cuales la interacción con el ambiente es fundamental para que se lleve a cabo el reordenamiento y refinamiento correcto de las conexiones sinápticas, permitiendo así establecer los circuitos sinápticos que serán responsables de una correcta fisiología en la etapa adulta. En la presente memoria, se han estudiado los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la plasticidad sináptica en la sinapsis establecida entre las células de la capa 4 (L4) y la capa 2/3 (L2/3) de la corteza somatosensorial primaria y la establecida entre las capas 2 (L2) y 4 (L4) de la corteza entorrinal (EC) medial (MPP) y lateral (LPP) y las células granulares (GC) del giro dentado (DG) de la formación hipocampal de ratón en diferentes etapas del desarrollo postnatal. En la sinapsis L4-L2/3 de corteza somatosensorial se ha estudiado una forma de *spike timing-dependent long-term depression* (t-LTD) que está presente hasta la cuarta semana postnatal (hasta P27) y que desaparece a P28. Investigando los mecanismos involucrados en la pérdida de esta forma de t-LTD durante el desarrollo se ha encontrado que esta pérdida de t-LTD está mediada por un aumento de los niveles de activación de receptores presinápticos de adenosina del tipo 1 (A_1Rs) que va aumentando con la maduración postnatal. La adenosina que activa estos A_1Rs es liberada por los astrocitos, por lo que esta pérdida de t-LTD con el desarrollo requiere de señalización astrocitaria. A edades mayores a P38 (P38-60), el protocolo que induce t-LTD hasta P27 induce en su lugar *spike timing-dependent long-term potentiation* (t-LTP). Esta t-LTP se ha encontrado que requiere de actividad en la célula postsináptica (entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L y fabricación y liberación de óxido nítrico -NO-), NMDAR y mGluR situados en la célula presináptica, siendo así, una forma de t-LTD de expresión presináptica. En las sinapsis L4, L2-GC de las MPP y LPP se ha descubierto que existe *spike timing-dependent LTD* (t-LTD) tanto cuando los axones vienen de la MPP como cuando vienen de la LPP. Estas t-LTDs son de expresión presináptica. La t-LTD de las sinapsis MPP-GC está presente hasta la tercera semana de desarrollo postnatal, requiere de receptores de tipo NMDA y mGluR presinápticos, síntesis y liberación de endocannabinoides por parte de la célula postsináptica y de actividad astrocitaria liberando glutamato, mientras que la t-LTD de las sinapsis LPP-GC no desaparece con la edad y no requiere NMDAR pero, al igual que la MPP-GC, sí requiere de mGluR presinápticos, fabricación y liberación de endocannabinoides por parte de la célula postsináptica y actividad astrocitaria liberando glutamato.

Abstract

One of the most important properties of the nervous system is its plasticity. During the postnatal development of the nervous system, there are critical periods of synaptic plasticity in which interaction with the environment is essential for the correct reordering and refinement of synaptic connections, thus allowing for the establishment of synaptic circuits that will be responsible for correct physiology in adulthood. In the present work, both the cellular and molecular mechanisms involved in synaptic plasticity as well as the determining factors of the absence of critical periods of plasticity in the synapse established between the cells of layer 4 (L4) and layer 2/3 (L2/3) of the medial (MPP) and lateral (LPP) entorhinal cortex (EC) and granule cells (GC) of the dentate gyrus (DG) of the mouse hippocampal formation have been studied at different stages of postnatal developmental. A form of *spike timing-dependent long-term depression* (t-LTD) has been studied in the L4-L2/3 synapse of the somatosensory cortex, which is present until the fourth postnatal week (up to P27) and disappears at P28. Investigating the mechanisms involved in the loss of this form of t-LTD during development, it has been found that this loss of t-LTD is mediated by an increase in the activation levels of presynaptic adenosine receptors type 1 (A₁Rs), which increases with postnatal maturation. The adenosine that activates these A₁Rs is released by astrocytes, so this loss of t-LTD with development requires astrocyte signaling. At ages older than P38 (P38-60), the protocol that induces t-LTD until P27 instead induces *spike timing-dependent long-term potentiation* (t-LTP). This t-LTP has been found to require activity in the postsynaptic cell (Ca²⁺ entry through voltage-dependent calcium channels and synthesis and release of nitric oxide -NO-), NMDAR and mGluR located in the presynaptic cell, thus being a form of t-LTD of presynaptic expression. In the L4, L2-GC synapse of the MPP and LPP, it has been discovered that there is *spike timing-dependent LTD* (t-LTD) both when the axons come from the MPP and when they come from the LPP. These t-LTDs are of presynaptic expression. The t-LTD of the MPP-GC synapse is present until the third week of postnatal development, requires presynaptic NMDA and mGluR receptors, synthesis, and release of endocannabinoids by the postsynaptic cell, and astrocytic activity releasing glutamate. While t-LTD of LPP-GC synapses does not disappear with the age and does not require NMDAR, like MPP-GC, it does require presynaptic mGluR, endocannabinoid production and release by the postsynaptic cell, and astrocytic activity releasing glutamate.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN.

1. PLASTICIDAD SINÁPTICA.....	17
1.1. HISTORIA DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA	17
1.2. TIPOS DE PLASTICIDAD.....	20
1.2.1. Plasticidad de corta duración.....	20
1.2.2. Plasticidad de larga duración.....	23
2. CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA.....	27
2.1. PLASTICIDAD EN LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA.....	30
3. CORTEZA ENTORRINAL Y GIRO DENTADO.....	32
3.1. PLASTICIDAD EN LA CORTEZA ENTORRINAL Y GIRO DENTADO.....	34
4. ASTROCITOS.....	34
5. RECEPTORES DE GLUTAMATO.....	39
5.1. Receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs).....	41
5.1.1. Receptores de NMDA.	41
5.2. Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs)	45

II. OBJETIVOS.

1. OBJETIVOS GENERALES	48
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. ANIMALES.....	51
2. OBTENCIÓN DEL TEJIDO Y PREPARACIÓN DE RODAJAS.....	51
2.1. Soluciones.....	52
3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	55
4. PROTOCOLOS EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS.....	57
5. FARMACOLOGÍA.....	58
6. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	59
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60

IV. RESULTADOS.

CAPÍTULO I: CORTEZA SOMATOSENSORIAL.....	64
1. t-LTD en la sinapsis de L4-L2/3 de la corteza somatosensorial primaria de ratón.	64
2. La pérdida durante el desarrollo de la t-LTD no requiere inhibición GABAérgica, pero implica un incremento en la inhibición mediada por la activación de los receptores de adenosina de tipo A ₁	68
3. La activación de A ₁ Rs a P13-27 cierra la ventana de plasticidad.....	72
4. La pérdida de la t-LTD durante el desarrollo requiere de la señalización de astrocitos para producir un aumento en los niveles de adenosina.	73
5. El protocolo que induce t-LTD a P13-37 induce t-LTP a P38-60.	77
6. Expresión presináptica de la t-LTP.....	79
7. La t-LTP presináptica requiere de receptores de tipo NMDA (NMDARs).....	80
8. La t-LTP presináptica requiere de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs)....	82
9. La t-LTP requiere de Ca ²⁺ postsináptico	84
10. La t-LTP presináptica requiere de óxido nítrico (NO).....	86
11. La t-LTP requiere de actividad astrocitaria	88
12. El aumento de la inhibición mediada por la activación de A ₁ Rs presinápticos está involucrado en la t-LTP.....	90
13. La activación de los A ₁ Rs a P13-27 convierte la t-LTD en t-LTP	92
14. Se requiere tanto adenosina como glutamato para inducir t-LTP.....	93
CAPÍTULO II: CORTEZA ENTORRINAL Y GIRO DENTADO.....	98
1. Inducción de t-LTD en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC.....	98
2. Las t-LTDs observadas en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC son de expresión presináptica.....	100
3. La t-LTD observada en la sinapsis MPP-GC se pierde a P22-28, no así la observada en la sinapsis LPP-GC	102
4. La t-LTD requiere de NMDARs presinápticos en la sinapsis MPP-GC, pero no en LPP-GC.....	103
5. La t-LTD presináptica requiere de mGluRs en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC	107
6. La inducción de t-LTD requiere de señalización cannabinoide en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC.....	109
7. La inducción de t-LTD requiere de actividad astrocitaria en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC.....	109

V. DISCUSIÓN.

CAPÍTULO I: CORTEZA SOMATOSENSORIAL	117
1. La t-LTD se pierde al final de la cuarta semana del neurodesarrollo postnatal en la sinapsis L4-L2/3.....	117
2. La pérdida de t-LTD con el desarrollo en la sinapsis L4-L2/3 involucra un aumento de la inhibición mediada por la activación de receptores presinápticos de adenosina de tipo A ₁	117
3. La adenosina que se libera como resultado de la señalización de los astrocitos es necesaria para la pérdida de plasticidad durante el neurodesarrollo	119
4. La t-LTD cambia a t-LTP presináptica a P38-60.....	120
5. La t-LTP de expresión presináptica requiere de NMDARs y mGluR1s.	121
6. La t-LTP de la corteza somatosensorial requiere de calcio postsináptico y NO	123
7. La t-LTP presináptica requiere de señalización de astrocitos.....	123
CAPÍTULO II: CORTEZA ENTORRINAL Y GIRO DENTADO.....	128
1. Se induce t-LTD en las sinapsis establecidas entre L2, L4 de la EC y las células granulares del DG	128
2. La t-LTD desaparece al final de la tercera semana del desarrollo en la sinapsis MPP-GC, pero continúa presente en la sinapsis LPP-GC.....	130
3. La t-LTD requiere de receptores de tipo NMDA en la sinapsis MPP-GC, no siendo así para la sinapsis LPP-GC.....	130
4. La t-LTD requiere de mGluRs y de señalización endocannabinoide tanto en la sinapsis MPP-GC como en la sinapsis LPP-GC.....	131
5. La t-LTD requiere de señalización astrocitaria en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC.	132
6. Importancia fisiológica de la spike timing-dependent plasticity en las sinapsis establecidas entre L2, L4 de EC y las células granulares del DG de hipocampo de ratón.....	134
VI. CONCLUSIONES.	
CONCLUSIONES.....	137
CONCLUSIONS	139
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	
REFERENCIAS.....	142
VIII. ANEXOS.....	162

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Fusión de vesículas sinápticas	21
Figura 2. Principales mecanismos presinápticos de la plasticidad de corta duración.....	23
Figura 3. Inducción y expresión de la spike-timing dependent plasticity (STDP).	25
Figura 4. Vías sinápticas para el procesamiento de información sensorial relacionada con los bigotes en la corteza de barril de roedores.....	28
Figura 5. Ilustraciones de las capas corticales.	29
Figura 6. Dos formas de LTD dependiente de NMDARs presinápticos en la sinapsis L4-L2/3..	31
Figura 7. Esquema de las conexiones corteza entorinal-hipocampo.....	32
Figura 8. Esquema de la sinapsis tripartita.	37
Figura 9. Expresión específica de astrocitos del dominio dn-SNARE	39
Figura 10. Tipos de receptores de glutamato y su organización estructural	40
Figura 11. Estructura y subunidades de los receptores NMDA.....	43
Figura 12. Principales formas de LTP y LTD.....	44
Figura 13. Forma de LTD dependiente de mGluRs y de señalización mediada por eCBs.....	46
Figura 14. Ejemplo de obtención del tejido y preparación de rodajas para los experimentos de L4-L2/3	52
Figura 15. Elementos del setup de registro	56
Figura 16. Esquema del protocolo utilizado para la inducción de la t-LTD y curso temporal de los experimentos.	58
Figura 17. Interpretación del CV	60
Figura 18. t-LTD ($\Delta t = -18$ ms) en las sinapsis de L4-L2/3 de la corteza somatosensorial primaria a la edad de P13-27	65
Figura 19. La t-LTD en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial está presente a P13-27 y se puede inducir a diferentes tiempos entre actividad pre y postsináptica, pero desaparece durante la cuarta semana de desarrollo	67
Figura 20. La pérdida de t-LTD se debe a la activación de A ₁ Rs y no a la activación de receptores GABA _A o GABA _B	70
Figura 21. La pérdida de t-LTD durante el desarrollo implica un aumento en la inhibición mediada por la activación A ₁ Rs..	71
Figura 22. Un aumento en la inhibición mediada por A ₁ Rs cierra la ventana de plasticidad para la t-LTD a la edad de P13-27	72

Figura 23. La adenosina involucrada en la prevención de la t-LTD a P28-37 proviene de los astrocitos	74
Figura 24. Los astrocitos se requieren para la pérdida de la t-LTD durante el neurodesarrollo...	76
Figura 25. El protocolo <i>post-pre</i> induce t-LTP a la edad de P38-60	78
Figura 26. La t-LTP inducida por un protocolo <i>post-pre</i> a P38-60 se expresa presinápticamente	80
Figura 27. La t-LTP presináptica requiere de NMDARs.....	81
Figura 28. La t-LTP presináptica requiere de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGluR1s) postsinápticos.....	83
Figura 29. Ca ²⁺ postsináptico es requerido para la inducción de t-LTP	85
Figura 30. El óxido nítrico (NO) es necesario para la inducción de t-LTP	87
Figura 31. Los astrocitos son requeridos para la inducción de t-LTP	89
Figura 32. Participación de los A ₁ R _s por acción de adenosina procedente de los astrocitos en la t-LTP.	91
Figura 33. Un aumento en la inhibición mediada por A ₁ R _s presinápticos convierte la t-LTD en t-LTP a P13-27	92
Figura 34. La liberación de glutamato y adenosina por los astrocitos es necesaria para la inducción de la t-LTP presináptica	94
Figura 35. El NO es necesario para que los astrocitos liberen gliotransmisores e inducir la t-LTP	96
Figura 36. Esquema que muestra la configuración experimental general y el protocolo utilizado	98
Figura 37. Un protocolo <i>post-pre</i> provocó t-LTD tanto en la sinapsis LPP-GC como en la sinapsis MPP-GC.....	99
Figura 38. Expresión presináptica de la t-LTD en la vía perforante durante el neurodesarrollo..	101
Figura 39. La t-LTD desaparece en la sinapsis MPP-GC en la cuarta semana del desarrollo, pero no en la sinapsis LPP-GC	102
Figura 40. La t-LTD presináptica requiere de NMDARs en la sinapsis MPP-GC, pero no en la sinapsis LPP-GC	104
Figura 41. Composición de subunidades de los NMDARs involucrados en t-LTD en la sinapsis MPP-GC.....	106
Figura 42. La t-LTD requiere de mGluRs en las sinapsis EC-DG	108

Figura 43. Los mGluRs involucrados en la t-LTD en las sinapsis EC-GC no se encuentran en la célula postsináptica	110
Figura 44. t-LTD requiere de señalización endocannabinoide	112
Figura 45. La t-LTD requiere de la liberación de glutamato por los astrocitos en las sinapsis EC-GC	114
Figura 46. Esquema que muestra la señalización en las etapas de desarrollo temprano (P13–27), juvenil (P28–37) y adulta (P38–60) en la sinapsis de la corteza somatosensorial (L4–L2/3)....	126
Figura 47. Esquema que muestra la señalización a P13–21 en las sinapsis establecidas entre las células de la corteza entorrinal y las granulares del giro dentado de hipocampo (LPP-GC y MPP-GC)	133

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Composición de la solución STOCK I.....	53
Tabla 2. Composición de la solución STOCK II	54
Tabla 3. Composición de la solución de current-clamp.....	54

Abreviaturas.

A₁R: receptor de adenosina de tipo 1.

AC: adenilato ciclase.

AMPAR: receptor de AMPA (ácido a-amino-3-hidroxi-S-metil-4-isoxazolepropiónico).

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

BAPTA: ácido 1,2-bis(2-aminofenoxy) etano-n,n,n',n'-tetraacético.

Ca²⁺: ion calcio.

CaMKII: proteína quinasa II dependiente del complejo Calcio/Calmodulina.

CB₁R: receptor cannabinoide de tipo 1.

CPA: N6-Ciclopentiladenosina.

CV: coeficiente de variación.

DAG: diacilglicerol.

D-AP5: ácido D-2-amino-5-fosfopentanoico.

DG: giro dentado (en inglés, *dentate gyrus*).

DMSO: dimetilsulfóxido.

Dox: Doxiciclina.

EC: corteza entorrinal (en inglés, *entorrinal cortex*).

eCB: endocannabinoide.

EGFP: proteína verde fluorescente (en inglés, *enhanced green fluorescent protein*).

EGTA: ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético.

eEPSC: corrientes postsinápticas excitadoras evocadas (en inglés, *evoked excitatory postsynaptic currents*).

eEPSP: potenciales postsinápticos excitadores evocados (en inglés, *evoked excitatory postsynaptic potentials*).

GC: células granulares (en inglés, *granule cells*).

Glu: glutamato.

Hz: hercio.

iGluR: receptor ionotrópico de glutamato.

IP₃: inositol trifosfato.

K⁺: ion potasio.

kHz: kilohercio.

L2/3: capa 2/3.

L2, L4: capas 2 y 4.

LPP: vía perforante lateral (en inglés, *lateral perforant path*).

LTD: depresión de larga duración (en inglés, *Long Term Depression*).

LTP: potenciación de larga duración (en inglés, *Long Term Potentiation*).

mg: miligramo.

Mg²⁺: ion magnesio

mGluR: receptor metabotrópico de glutamato.

min: minuto.

mL: mililitro.

mM: milimolar.

mOsm: miliosmoles.

MPP: vía perforante medial (en inglés, *medial perforant path*).

ms: milisegundo.

mV: milivoltio.

Na⁺: ion sodio.

nM: nanomolar.

NMDAR: receptor de NMDA (ácido N-metil-D-aspartato).

NO: óxido nítrico.

NT: neurotransmisor.

P: postnatal (día).

PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato.

PKA: proteína quinasa A.

PKC: proteína quinasa C.

PLC: fosfolipasa C.

Post-pre: protocolo en el cual el potencial de acción postsináptico se provoca 18 ms antes del inicio de los eEPSP.

PP: vía perforante (en inglés, *perforant path*).

PP1: proteína fosfatasa 1.

PPD: depresión por pares de pulsos (en inglés, *paired-pulse depression*).

PPF: facilitación por pares de pulsos (en inglés, *paired-pulse facilitation*).

PPR: ratio de pares de pulsos (en inglés, *paired-pulse ratio*).

Pr: probabilidad de liberación de neurotransmisor.

R: registro.

S: estimulación.

s: segundos.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNP: Sistema Nervioso Periférico.

STDP: plasticidad dependiente del orden y del intervalo temporal entre potenciales de acción (en inglés, *spike timing dependent plasticity*).

t-LTD: depresión de larga duración dependiente de la coincidencia temporal de la actividad postsináptica y presináptica (en inglés, *spike timing long-term depression*).

t-LTP: potenciación de larga duración dependiente de la coincidencia temporal de la actividad presináptica y postsináptica (en inglés, *spike timing long-term potentiation*).

VDCC: canales de calcio dependiente de voltaje (en inglés, *voltage-dependent calcium channels*).

VPM: núcleo talámico posteromedial ventral.

Δt: intervalo temporal.

µM: micromolar.

σ: desviación típica.

I. *Introducción*

1. PLASTICIDAD SINÁPTICA.

1.1. HISTORIA DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA.

Se podría decir que el punto de partida de la neurociencia actual fue Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) que en su trabajo titulado “doctrina de la neurona” definía a las neuronas como células cerebrales individuales que se conectan entre sí enviando y recibiendo información (Jones, 1999). Para poder observar y estudiar la estructura de las neuronas, Cajal perfeccionó la técnica de tinción de células descubierta anteriormente por Camillo Golgi (1843-1926) (DeFelipe, 2006). Las aportaciones de Cajal tuvieron una gran influencia en nuevos estudios sobre el sistema nervioso que se abordaron desde diferentes disciplinas.

En concreto, en el campo de la fisiología, ya a finales del siglo XVIII Luigi Galvani (1737-1789) había acuñado el término “electricidad animal”, tras descubrir que las células musculares producían una respuesta contráctil al ser tocadas con dos metales de distinta naturaleza (Verkhratsky y Parpura, 2014). Más tarde, en el siglo XIX, Johannes Müller (1801-1858) realizó numerosas contribuciones que supusieron un giro en la forma de abordar la fisiología (Finger y Wade, 2002). Gran parte de su trabajo estaba dedicado a la investigación de la acción nerviosa y la fisiología de los órganos sensitivos. Sus alumnos, Hermann von Helmholtz (1821-1894) y Emil Dubois-Reymond (1818-1896) hicieron importantes aportaciones al desarrollo de los fundamentos de la electrofisiología. El primero descubrió que la actividad eléctrica de las células nerviosas es la forma de transmitir información desde un extremo a otro de una célula, y también desde una célula a otra; mientras que el segundo descubrió el potencial de acción nervioso en células musculares.

La etimología del término plasticidad proviene de la palabra griega “*plastikós*” que se puede traducir como “moldeable” y se empezó a usar en biología para referirse a la capacidad de un organismo para responder a cambios en su medio ambiente. No obstante, el origen del concepto plasticidad aplicado al campo de la neurociencia no está claro y habría que remontarse a finales del siglo XIX para hablar de los científicos que sentaron las bases de lo que conocemos como neurociencia moderna, aunque Cajal fue el primero en mencionar a la plasticidad ya en el año 1894 (revisado en De Carlos y Borrell, 2007).

Sin embargo, no fue hasta el siglo XX cuando Charles Sherrington (1857-1952) y Michael Foster (1836-1907) acuñaron el término “sinapsis” para referirse al contacto entre neuronas que Cajal previamente había denominado como “uniones”. Además, Korbinian Brodmann (1868-1918) estableció la existencia de cincuenta y dos áreas con funciones específicas en la corteza cerebral humana. A mediados de este siglo XX, el psicólogo Donald Hebb (1904-1985) con la publicación de su obra más célebre *La organización del comportamiento* (1949) desarrolló una teoría sobre la existencia de un vínculo entre el comportamiento y la actividad cerebral, sentando los principios de la psicobiología. Todo su trabajo dio origen al conocido *Postulado de Hebb* que afirma que las conexiones entre las neuronas se fortalecen o refuerzan si dos neuronas se activan de forma contigua en el tiempo y el espacio. Las conexiones generan cambios en la estructura cerebral que favorecen la conformación de redes neuronales. Su postulado más famoso recoge que:

“cuando el axón de la célula A está suficientemente cerca de la célula B como para estimularla y contribuye de forma repetida o persistente en su disparo, ocurren ciertos procesos de crecimiento o cambios metabólicos en una o ambas células de modo tal que aumenten tanto la eficiencia de la célula A como la capacidad de estimulación de B”.

De este modo, la activación repetida de las neuronas debería incrementar la fuerza de conexión entre poblaciones de neuronas interconectadas. La propuesta de Hebb tuvo un fuerte impacto en la neuropsicología y en muchos planteamientos desarrollados para el estudio del aprendizaje y la memoria.

Más tarde, el científico estadounidense Eric Kandel, fue capaz de relacionar modificaciones del comportamiento con transmisión sináptica y aprendizaje utilizando una especie de molusco gasterópodo, *Aplysia*. El molusco presentaba un reflejo de defensa innato y se podía estudiar la modificación de éste mediante formas de aprendizaje asociativo gracias a la simplicidad de su sistema nervioso con un número reducido de células fácilmente identificables, lo cual permitía la estimulación directa de las mismas (Kandel, 1964). Así, se pudo comprobar también que la aplicación repetitiva del estímulo transformaba la memoria transitoria o de corta duración, en duradera o de larga duración. Este estudio dio lugar a otros más complicados con animales cada vez más complejos que trataban de relacionar plasticidad sináptica y memoria aunque, a día de hoy, dicha relación no está bien establecida todavía (Sjöström et al., 2008).

A finales del siglo XX, Erwin Neher y Bert Sakmann recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina (1991) por el desarrollo de la técnica de *Patch-Clamp* (Verkhratsky y Parpura, 2014). Esta técnica permite el estudio de las propiedades eléctricas -tanto activas como pasivas- de las células. En su configuración de célula completa (*whole-cell*), a través de la generación de un sello de alta resistencia entre el electrodo de registro y la membrana celular, se pueden monitorizar con gran resolución temporal y espacial las corrientes iónicas que fluyen a través de los canales que están presentes en una membrana celular, permitiendo caracterizarlos.

En la actualidad, se sabe que una de las propiedades más importantes del sistema nervioso de los mamíferos es su **plasticidad**, definida como la capacidad de la actividad neuronal generada por una experiencia para modificar la función del circuito neuronal y, por lo tanto, modificar procesos cognitivos superiores en respuesta a las demandas de esas experiencias (Citri y Malenka, 2008). La **plasticidad sináptica** se refiere específicamente a la modificación de la eficacia de la transmisión sináptica, lo cual depende de la actividad de las sinapsis preexistentes, y durante más de un siglo se ha propuesto que desempeña un papel central en la capacidad del cerebro para incorporar experiencias transitorias en procesos de memoria persistentes o más duraderos (Citri y Malenka, 2008). También existen evidencias de que la plasticidad sináptica desempeña una función central en el desarrollo temprano de los circuitos neuronales y cada vez hay más investigaciones que afirman que las deficiencias en los mecanismos de plasticidad sináptica contribuyen a la aparición o mantenimiento de diferentes trastornos neuropsiquiátricos (Citri y Malenka, 2008; Bliss et al., 2014).

Los cambios plásticos que van sucediendo a lo largo del desarrollo cerebral temprano ocurren durante **períodos críticos o limitantes** en los que las influencias ambientales son fundamentales, la interacción con el ambiente es necesaria y, si esta no se da, la función que va asociada a este periodo de plasticidad estará permanentemente comprometida. En estos momentos temporales las alteraciones del contexto tienen un impacto máximo sobre el desarrollo, es decir, un suceso dado o su ausencia puede impedir que ocurra un desarrollo normal e incluso que los patrones anormales resultantes sean irreversibles. De este modo, la pérdida de plasticidad en sinapsis concretas y en etapas específicas puede producir una serie de efectos particulares e incluso dar lugar a la aparición de trastornos del desarrollo (Hensch, 2004). Además de estos períodos críticos, existen también **períodos permisivos o sensitivos** menos rígidos que los críticos, donde la

sensibilidad a los estímulos ambientales es muy alta y en los cuales, si no ocurre la interacción adecuada con el ambiente, la función se puede recuperar más tarde en el desarrollo. Tanto los períodos críticos como los permisivos son ***ventanas de plasticidad***.

Por lo tanto, dilucidar los mecanismos moleculares concretos que subyacen a la plasticidad sináptica en diferentes regiones del cerebro es fundamental para comprender la base neuronal de la función cerebral normal y patológica; siendo muy útil el uso de técnicas como la electrofisiología para estudiar esos mecanismos que rigen la plasticidad.

1.2. TIPOS DE PLASTICIDAD.

Los procesos plásticos que tienen lugar en las sinapsis pueden ser divididos en función de su duración en Plasticidad de Corta Duración (en inglés, *Short-Term Plasticity*, STP) y Plasticidad de Larga Duración (en inglés, *Long-Term Plasticity*).

1.2.1. Plasticidad de corta duración.

Cuando se habla de plasticidad de corta duración (STP) se hace referencia a un rango temporal que puede oscilar desde pocos milisegundos hasta minutos y que incluye tanto la potenciación como la depresión de la actividad sináptica. En este sentido, la *facilitación por pares de pulsos* (en inglés, *paired-pulse facilitation*, PPF) o la *depresión por pares de pulsos* (en inglés, *paired-pulse depression*, PPD) son los tipos de plasticidad de corta duración más comunes.

Cuando se utilizan pares de estímulos separados por decenas de milisegundos repetidos en el tiempo, dando como resultado un incremento en la magnitud de la segunda respuesta de los potenciales postsinápticos excitadores evocados (en inglés, *evoked excitatory postsynaptic potentials*, eEPSP), se denomina *facilitación por pares de pulsos*, lo cual se traduce como un aumento en la eficacia sináptica (Zucker y Regehr, 2002). Por el contrario, si disminuye la amplitud de los eEPSP se trataría de una *depresión sináptica* o disminución de la eficacia en la transmisión sináptica.

Los diferentes tipos de STP surgen principalmente de cambios en la *probabilidad de liberación de neurotransmisor* (en inglés, *probability of neurotransmitter release*, Pr), que es una consecuencia de la naturaleza inherentemente estocástica de los procesos moleculares y celulares que impulsan la exocitosis de vesículas. Por lo tanto, para cada potencial de acción, la liberación de neurotransmisores tiene una cierta probabilidad de ocurrencia en las sinapsis del Sistema Nervioso Central que define la confiabilidad de una sinapsis para transmitir la señal del potencial de acción y determina la fuerza sináptica promedio (Branco y Staras, 2009). Es decir, la *Pr* determina la fuerza de una sinapsis y, por lo tanto, define la eficacia sináptica (Flight, 2008).

Para que se produzca la liberación del neurotransmisor (NT) es necesaria la entrada de Ca^{2+} al terminal presináptico a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (en inglés, *voltage-dependent calcium channels*, VDCCs). Una vez dentro, el Ca^{2+} se une a sensores de Ca^{2+} intracelulares que a su vez liberan más Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Schiess et al., 2006), desencadenando la fusión de las vesículas sinápticas (almacén de NT) con la membrana plasmática gracias a la formación del complejo SNARE - receptores de proteínas de fijación del factor N- etilmaleimida soluble (NSF) - (Kavalali, 2015). Como resultado, el NT es liberado a la hendidura sináptica por exocitosis (Figura 1).

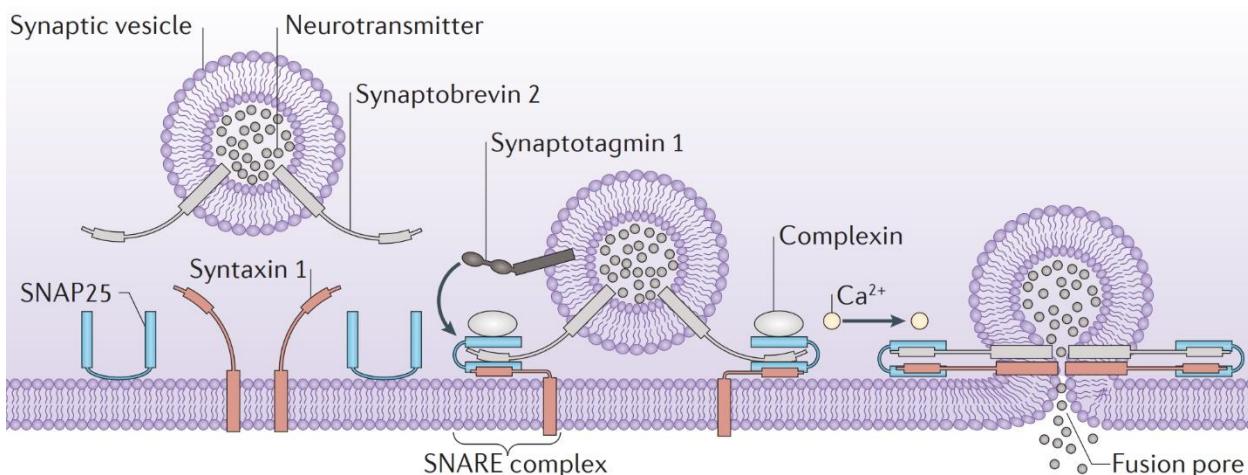


Figura 1. Fusión de vesículas sinápticas. El complejo SNARE está formado por las proteínas sinaptobrevina 2, sintaxina 1 y proteína SNAP25 que median la fusión de vesículas sinápticas. La proteína soluble complexina se une selectivamente al complejo SNARE con alta afinidad y regula la fusión. Este proceso es dependiente de Ca^{2+} . Tomado de Kavalali, 2015.

Se puede producir un incremento a corto plazo de la liberación de neurotransmisor por tres procesos que se producen a causa de las variaciones transitorias de Ca^{2+} intracelular en el terminal presináptico tras la llegada de los potenciales de acción (Colino et al., 2002) y que tienen diferente duración: milisegundos (**facilitación**), aproximadamente 30 segundos (**aumentación**) y varios minutos (**potenciación**). También existen otros mecanismos, que pueden ser tanto presinápticos como postsinápticos, que median una disminución del potencial de acción (Zucker y Regehr, 2002): **fatiga sináptica**, las neuronas no pueden generar potenciales de acción debido a un agotamiento de las vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores; y **depresión de corta duración** como la desensibilización de los receptores, donde los canales regulados por ligando entran en un estado en el cual no pueden volver a ser estimulados en un periodo temporal breve.

Una aproximación indirecta para identificar si existen cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor es el análisis de la ratio por pares de pulsos (en inglés, *paired-pulse ratio*, PPR). La PPR es definida como la relación o el cociente entre la magnitud de la segunda y la primera respuesta postsináptica tras haber aplicado un par de estímulos separados por un intervalo de tiempo. Si la segunda respuesta es mayor con respecto a la primera, se trata de una PPF (aumenta la probabilidad de liberación) y si ocurre, al contrario, y la segunda respuesta es menor que la primera, será una PPD (disminuye la probabilidad de liberación). (Figura 2).

- La PPF se observa a intervalos entre estímulos de 20 a 500 ms y se atribuye principalmente a los efectos del incremento del flujo de calcio (Ca^{2+}) residual hacia el interior del terminal presináptico (Citri y Malenka, 2008), aunque también es probable que estén involucrados mecanismos adicionales que pueden implicar la activación de proteínas quinasas que modulan la actividad de las fosfoproteínas presinápticas afectando a la probabilidad de liberación o a la activación de algunos receptores (Markram et al., 2011; Jackman y Regehr, 2017).
- La PPD se suele observar a intervalos cortos de menos de 20 ms (Citri y Malenka, 2008) y se debe normalmente a la inactivación de los canales de sodio, la disminución de la actividad de los canales de calcio o un agotamiento transitorio del grupo de vesículas preparadas para la liberación (Zucker y Regehr, 2002; Blitz, Foster y Regehr, 2004; Jackman y Regehr, 2017).

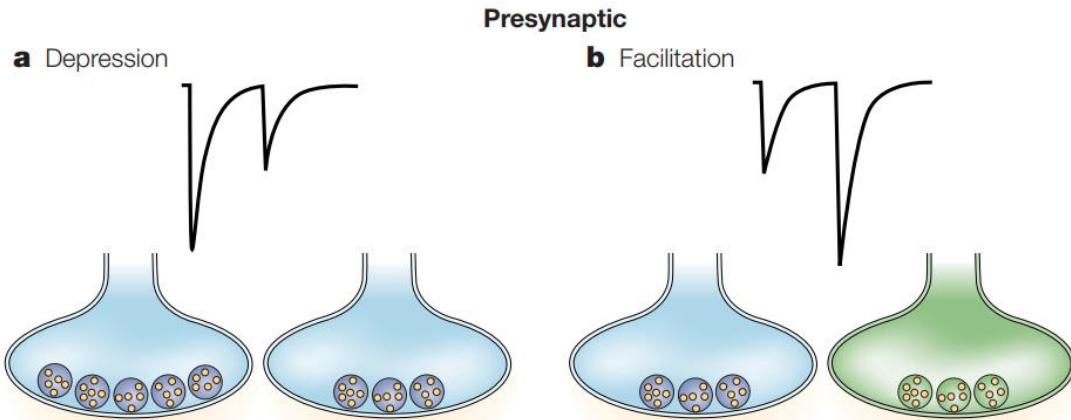


Figura 2. Principales mecanismos presinápticos de la plasticidad de corta duración. (A) La depresión sináptica da como resultado una segunda eEPSC o corriente excitadora postsináptica evocada (en inglés, *evoked excitatory postsynaptic current*) de menor amplitud. Hay menos vesículas disponibles para liberar en el segundo estímulo (derecha) que en el primero (izquierda). (B) La facilitación da como resultado una segunda eEPSC de mayor amplitud. Una elevación residual del Ca^{2+} intracelular (señalado en verde) junto con la entrada de Ca^{2+} en respuesta al segundo estímulo, da como resultado una mayor liberación. Modificado de Blitz et al., 2004.

1.2.2. Plasticidad de larga duración.

Los cambios plásticos de larga duración se definen como cambios en la eficacia sináptica que se mantienen en el tiempo y cuya naturaleza puede ser tanto presináptica como postsináptica. Se puede diferenciar entre procesos de potenciación de larga duración (en inglés, *long-term potentiation*, LTP) y depresión de larga duración (en inglés, *long-term depression*, LTD) (Bliss y Collingridge, 2019). Existen evidencias experimentales que han propuesto varios mecanismos, que no son excluyentes entre sí, sobre el origen de los cambios asociados con la esta plasticidad:

- 1) Cambios en la probabilidad de liberación (Malinow y Tsien, 1990).
- 2) Inserción o internalización de receptores de tipo AMPA en la membrana de la neurona postsináptica (Huganir y Nicoll, 2013).
- 3) Fosforilación y de-fosforilación de los receptores de tipo AMPA que dan lugar a cambios en la conductancia de estos mismos (Lee et al., 2000).

Muchos estudios relacionados con la plasticidad sináptica se inspiraron principalmente en el postulado de Hebb, sosteniendo un paradigma clásico en el que la fortaleza o debilitamiento de la eficacia sináptica dependía fundamentalmente de la frecuencia de la estimulación neuronal. Sin embargo, años más tarde se descubrió que protocolos mucho más suaves de actividad, consistentes en emparejar actividad presináptica y postsináptica en un breve intervalo de tiempo de forma repetitiva inducen cambios plásticos tanto en forma de LTP como de LTD. A la plasticidad así inducida se le denomina ***spike timing-dependent plasticity (STDP)*** (Song et al., 2000).

La STDP es una forma de plasticidad de larga duración detectada en todos los organismos, desde insectos hasta humanos (Markram et al., 2011), así como en diferentes regiones cerebrales y tipos neuronales (Sjöström et al., 2008; Banerjee et al., 2010; Markram et al., 2012). Esta forma de plasticidad probablemente esté involucrada en el refinamiento de las conexiones sinápticas que se produce durante el desarrollo y en procesos de aprendizaje y memoria en adultos (Dan y Poo, 2001; Feldman y Brecht, 2005).

En la STDP, el orden y el intervalo temporal en una escala de milisegundos entre los potenciales de acción presinápticos y postsinápticos son los que determinan la dirección y la magnitud de los cambios en la transmisión sináptica (Figura 3). De esta forma, emparejamientos de la actividad presináptica seguida de la actividad postsináptica inducen una potenciación de larga duración (en inglés, ***spike timing long-term potentiation, t-LTP***); mientras que, si el orden es invertido, es decir, la actividad postsináptica es seguida de la presináptica, inducen una depresión de larga duración (en inglés, ***spike timing long-term depression, t-LTD***) (Brzosko et al., 2019). En general, para inducir STDP, el intervalo de tiempo entre potenciales presinápticos y postsinápticos emparejados debe ser inferior a 25 ms, aunque se ha sugerido una ventana de tiempo significativamente más amplia (hasta 150-200 ms de diferencia) para la inducción de la t-LTD (Feldman, 2000; Lin et al., 2006). La STDP proporciona una buena explicación para las modificaciones sinápticas que dependen de la actividad simultánea de las neuronas presinápticas y postsinápticas, y se considera que es un mecanismo celular subyacente al refinamiento impulsado por la actividad de los circuitos en desarrollo en el cerebro (Song y Abbott, 2001; Lin et al., 2006).

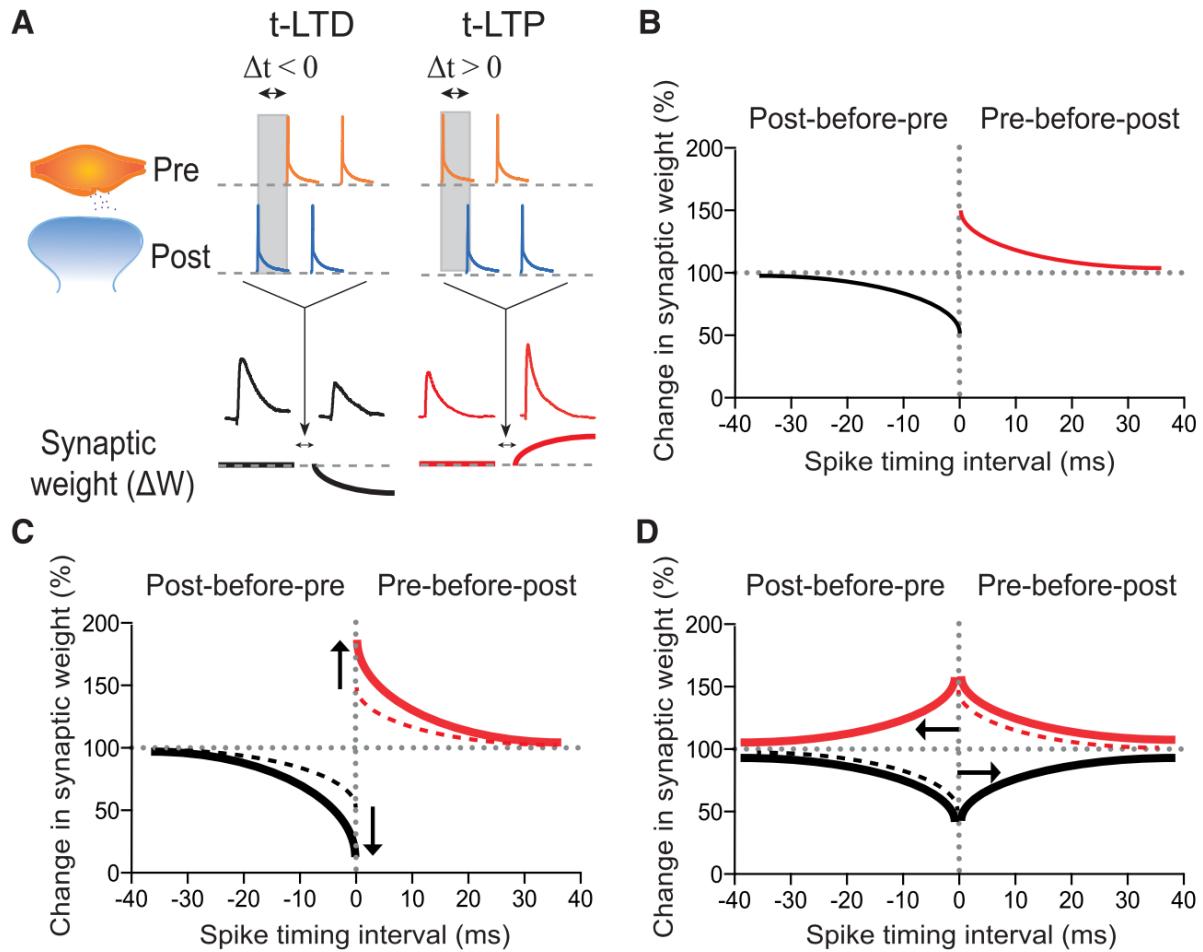


Figura 3. Inducción y expresión de la *spike-timing dependent plasticity* (STDP). (A) La STDP se induce mediante emparejamientos repetidos de potenciales de acción presinápticos y postsinápticos. (B) Depende del orden y la coincidencia temporal en milisegundos de los potenciales: emparejamientos de potenciales de acción presinápticos seguidos de postsinápticos (protocolo *pre-post*) inducen una *potenciación de larga duración* (*t-LTP*), mientras que emparejamientos de potenciales postsinápticos seguidos de los presinápticos (protocolo *post-pre*) inducen *depresión de larga duración* (*t-LTD*). (C y D) Tanto la magnitud (C) como el orden temporal (D) pueden modular la plasticidad. Tomado de Brzosko et al., 2019.

A pesar del importante papel de la STDP en muchas funciones cerebrales, los mecanismos responsables de su inducción y expresión no se conocen bien. Se han descrito algunos mecanismos de inducción de la plasticidad de larga duración muy variados, siendo los más conocidos aquellos que dependen de la activación de receptores de glutamato de tipo NMDA (Bliss y Collingridge, 2019). Además, los mecanismos de inducción, en general, dependen de diferentes factores: tipo de

sinapsis, especie animal, edad de los animales, condiciones experimentales (temperatura ambiente, fisiológica, etc.)

Otras formas adicionales de plasticidad sináptica de larga duración identificadas más recientemente incluyen la *plasticidad homeostática* y la *metaplasticidad*.

- La *plasticidad homeostática* describe fenómenos compensatorios que dependen del grado de actividad de los circuitos neuronales. De esta manera, perturbaciones que aumenten la actividad del circuito son compensadas mediante distintos mecanismos que causan una disminución de la fuerza sináptica. Y, al contrario, las reducciones prolongadas de la actividad general provocan un aumento neto de la fuerza sináptica total. Esta forma de plasticidad opera en una escala de tiempo mucho más lenta que la LTP o LTD y puede ser particularmente importante durante el desarrollo de circuitos neuronales (Citri y Malenka, 2008).
- La *metaplasticidad* implica un cambio en el estado fisiológico o bioquímico de las neuronas o sinapsis que altera su propia capacidad para generar plasticidad, modificar su magnitud, o alterar el sentido de la misma (Abraham, 2008). En otras palabras, la historia anterior de la actividad sináptica influye en el estado sináptico actual y, por tanto, en el grado de LTP o LTD producido por un protocolo experimental dado.

2. CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA.

La corteza somatosensorial es una de las regiones cerebrales más empleadas en el estudio de la transmisión y la plasticidad sináptica. Esta estructura se localiza en el lóbulo parietal, procesa el tacto y la información proprioceptiva; y se organiza en 6 capas corticales definidas como: capa 1 (L1), capa 2 (L2), capa (L3), capa 4 (L4), capa 5 (L5) con sus subdivisiones 5A (L5A) y 5B (L5B) y la capa 6 (L6) con las subdivisiones 6A (L6A) y 6B (L6B). Las capas L2 y L3 pueden presentar algunas diferencias funcionales (Bureau et al., 2006) pero se suelen englobar como una sola capa (L2/3). Esta terminología fue introducida por Lorente de Nó (1922) para el estudio con ratones y adoptada por Valverde (1989) para las ratas (Feldmeyer, 2012).

En los roedores existe una zona en la corteza somatosensorial primaria (S1) llamada corteza de *barries*. Los barries son una estructura destacada del sistema sensorial que procesa la información táctil procedente de las vibriras o bigotes (Fox, 2002). La corteza de barries fue descrita por primera vez por Woolsey y Van der Loss (1970) y su nomenclatura se debe a las formas en columnas cilíndricas que pueden verse en la capa 4, por la distribución de las neuronas que se encuentran ahí y los axones que llegan a la misma. Estos barries de la capa 4 están dispuestos somato-tópicamente de una manera casi idéntica a la disposición de los bigotes en el hocico del roedor. Es decir, cada bigote individual está representado y vinculado funcionalmente en una unidad anatómica concreta, el "barrel", lo que permite una delimitación precisa de la organización funcional, el desarrollo y la plasticidad (Figura 4A, B). Por ello, la corteza somatosensorial es de las más utilizadas para estudiar el aprendizaje y la memoria sensorial (Petersen, 2007).

Las proyecciones que envían y procesan la información táctil desde los bigotes hasta la corteza de barries de un roedor pasan por el núcleo talámico posteromedial ventral (*ventral posteromedial*, VPM) que contiene, al menos, dos compartimentos principales que representan vibriras: el dorsomedial (VPMdm), que pertenece a la *vía aferente lemniscal*, donde los aferentes procedentes de cada bigote inervan su barril L4 correspondiente; y el ventrolateral (en inglés, VPMvl), que pertenece a la *vía aferente extralemniscal*, donde los barries reciben impulsos de múltiples bigotes (Feldman y Brecht, 2005; Haidarliu et al., 2008). También existen proyecciones que pasan por el núcleo talámico medial posterior (*posterior medial thalamic nucleus*, POM) y se dirigen a otras capas evitando los barries (Petersen, 2007).

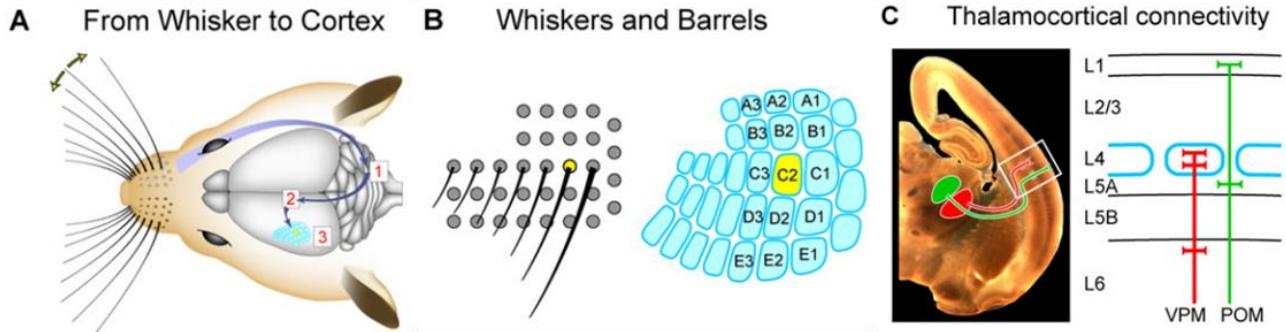


Figura 4. Vías sinápticas para el procesamiento de información sensorial relacionada con los bigotes en la corteza de barril de roedores. (A) Representación de la conexión entre los bigotes y la corteza somatosensorial en un roedor. (B) Izquierda: disposición de los folículos de los bigotes en el hocico de un roedor; derecha: “bariles” de la capa 4 de la corteza somatosensorial primaria, dispuestos en un patrón casi idéntico a los bigotes. (C) Vías talamocorticales paralelas importantes para enviar señales de información sensorial relacionada con los bigotes a la corteza. Neuronas en VPM (en rojo, a la izquierda) envían información glutamatérgica y de señal relacionada principalmente con los movimientos de un solo bigote. Los axones de las neuronas VPM terminan predominantemente en capa 4, con una inervación menor en la capa superior 6 (derecha). Las neuronas del POM (en verde, izquierda) tienen campos receptivos más amplios y sus axones evitan los bariles de la capa 4 y se dirigen principalmente a las capas 1 y 5A (derecha). Tomado y modificado de (Petersen, 2007).

Histológicamente, la corteza cerebral se organiza en seis capas o láminas horizontales claramente diferenciables según el tamaño y forma de los somas celulares (Valverde, 2002) (Kandel et al., 2014) (Figura 5):

- **Capa molecular (I):** es la más superficial. Consiste en una red densa de fibras nerviosas que derivan de dendritas de células piramidales y fusiformes, los axones de células estrelladas y de Martinotti. También se encuentran las células horizontales de *Cajal-Retzius*, que son exclusivas de esta capa.
- **Capa granular externa (II):** compuesta por una densidad variable de células pequeñas tanto estrelladas como piramidales.

- **Capa piramidal externa (III):** contiene predominantemente células piramidales de tamaño mediano que liberan glutamato. También se pueden encontrar células granulares, pero en muy poca proporción.
- **Capa granular interna (IV):** consta principalmente de células estrelladas que pueden ser excitadoras e inhibidoras y una pequeña cantidad de células piramidales.
- **Capa piramidal interna (V):** principalmente contiene células piramidales excitadoras de gran tamaño o de tamaño mediano, aunque también hay células estrelladas.
- **Capa multiforme o polimórfica (VI):** compuesta principalmente por neuronas fusiformes, otras piramidales y algunas interneuronas.

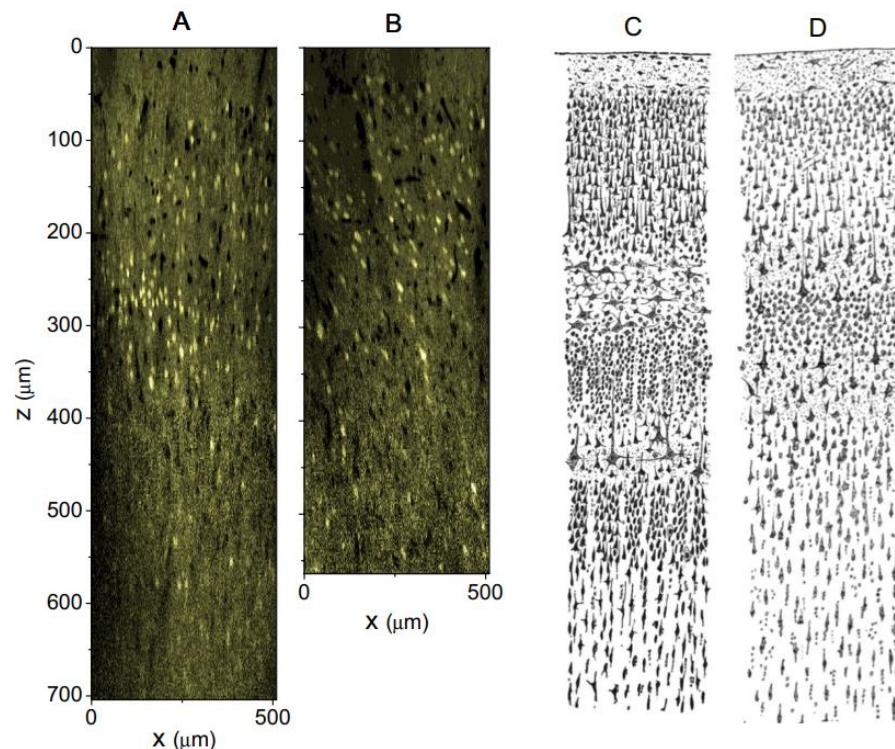


Figura 5. Ilustraciones de las capas corticales. (A, B) Imágenes adquiridas con microscopía de dos fotones de la corteza visual y de la corteza motora respectivamente. (C, D) Ilustraciones realizadas por Ramón y Cajal (1911) en corteza visual y corteza motora de un adulto humano usando la tinción de Nissl. Tomado de Li et., al. 2019.

2.1. PLASTICIDAD EN LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA.

La sinapsis estudiada en esta memoria es la establecida entre las células de la capa 4 y las células piramidales de la capa 2/3 de la corteza somatosensorial primaria de ratón (L4-L2/3). En esta sinapsis, se ha descrito en animales jóvenes una forma de t-LTD de naturaleza presináptica (Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006), que requiere de receptores de tipo NMDA presinápticos (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008) localizados en los axones de las neuronas de L4 (Rodríguez-Moreno et al., 2011) y que requiere de la participación de los astrocitos (Min y Nevian, 2012; Rodríguez-Moreno et al., 2013).

En esta misma sinapsis, también se ha descrito otra forma de LTD de expresión presináptica que puede ser inducida por una ráfaga de tres potenciales presinápticos seguidos, dentro de una ventana de tiempo restringida, por otro también presináptico (p-LTD). Esta nueva forma de LTD requiere de receptores NMDA presinápticos y calcineurina, pero es independiente de la señalización postsináptica y de la activación de los astrocitos (Rodríguez-Moreno et al., 2013). (Figura 6)

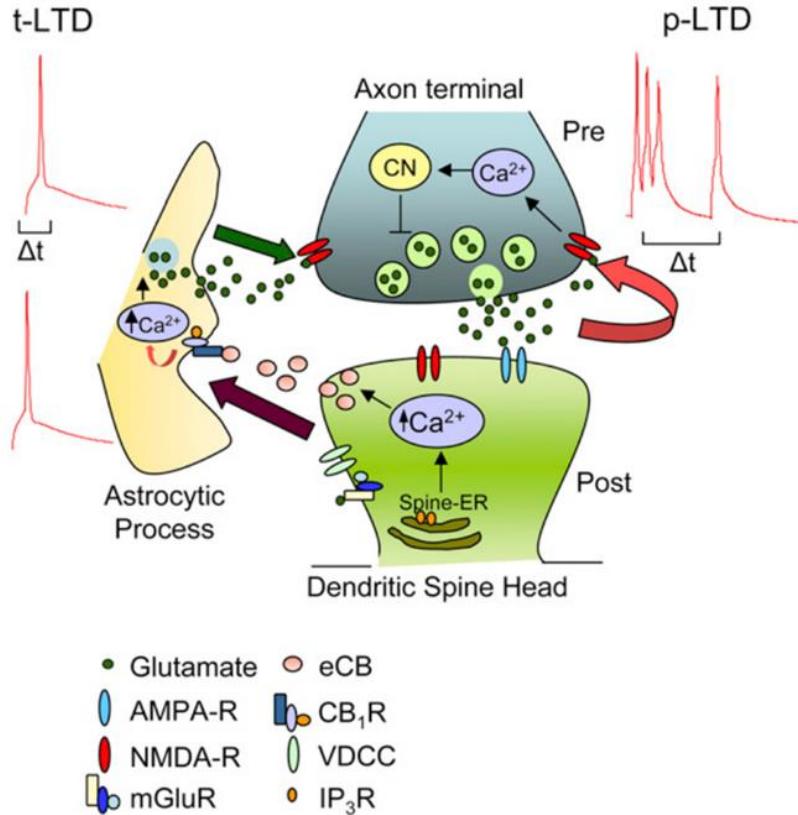


Figura 6. Dos formas de LTD dependiente de NMDARs presinápticos en la sinapsis L4-L2/3. Izquierda: t-LTD durante el protocolo *post-pre*, los potenciales de acción postsinápticos activan los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (VDCC) y el glutamato liberado presinápticamente activa los mGluRs postsinápticos, que activan sinérgicamente la PLC, lo que conduce a la generación y liberación postsináptica de endocannabinoides (eCBs). La señal de eCBs conduce a la activación de los receptores CB₁ presentes en los astrocitos, lo que facilita la liberación de glutamato de estos, activando los NMDARs presinápticos en las células de L4. Derecha: p-LTD no requiere de mGluRs ni CB₁. Una ráfaga de tres potenciales de acción presinápticos evoca la liberación de glutamato que activa los receptores NMDARs presinápticos cuando es seguido por un único potencial presináptico. Esto conduce a un aumento del Ca²⁺ presináptico y depresión sináptica, requiriendo de calcineurina (CN), sin necesitar a la neurona postsináptica ni a los astrocitos. Tomado de Rodríguez Moreno et al., 2013.

3. CORTEZA ENTORRINAL Y GIRO DENTADO.

El giro dentado (en inglés, *dentate gyrus*, DG) es un componente principal del circuito trisináptico del hipocampo, que transmite información desde la corteza entorinal (en inglés, *entorinal cortex*, EC) a CA3, que a su vez se proyecta a la región CA1, participando así en la codificación, consolidación y recuperación de la memoria (Yang y Dani, 2014; Stepan et al., 2015; Di Castro y Volterra, 2022). Las células granulares son la principal población celular presente en el DG y reciben información sensorial polimodal de las cortezas parahipocampal y perirrininal. Las capas 2 (L2) y 4 (L4) de la EC se proyectan al DG de la formación hipocampal a través de la vía perforante (en inglés, *perforant path*, PP) (Witter, 2007). Esta estructura se diferencia en la corteza entorinal medial (en inglés, *medial entorinal cortex*, MEC) y corteza entorinal lateral (en inglés, *lateral entorinal cortex*, LEC). Mientras que la LEC envía información al hipocampo a través de la vía perforante lateral (en inglés, *lateral perforant path*, LPP), la MEC envía información a través de la vía perforante medial (en inglés, *medial perforant path*, MPP) (Collitti-Klausnitzer et al., 2021). Así, ambas estructuras, lateral y medial, están segregadas anatómicamente e inervan respectivamente el tercio distal y el tercio medio de la capa molecular de las células granulares (en inglés, *granular cells*, GC) del DG (Di Castro y Volterra, 2022). (Figura 7).

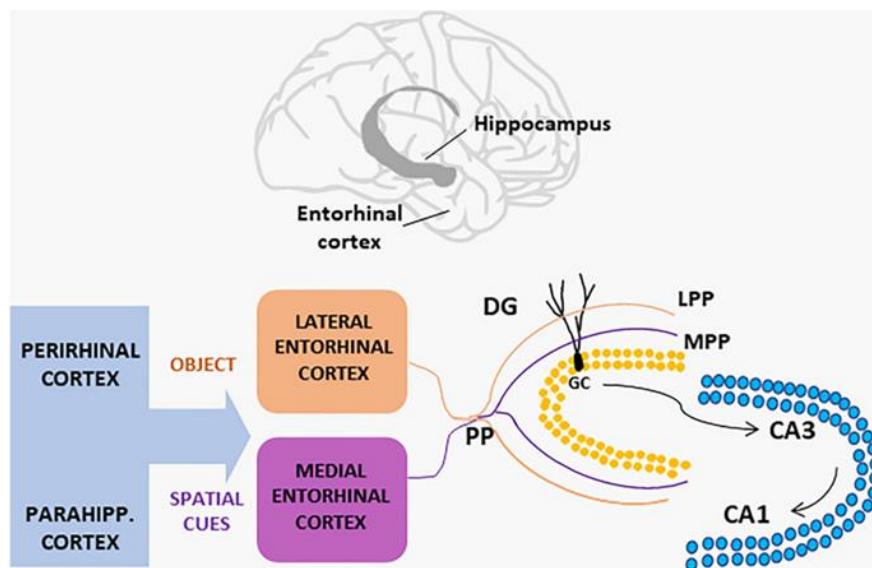


Figura 7. Esquema de las conexiones corteza entorinal-hipocampo. Tomado de Di Castro y Volterra, 2022.

Los dos tipos de proyecciones de la EC no solo están segregados anatómicamente, sino que también transmiten entradas de diferente naturaleza al hipocampo, lo que implica que la MPP y la LPP probablemente participan en diferentes funciones (Di Castro y Volterra, 2022). Según la evidencia obtenida hasta la fecha, parece que la LPP transmite información no espacial, compuesta por elementos de tipo olfativo, auditivo y visual (como reconocimiento del objeto) al DG; mientras que la MPP transmite información espacial y de autolocalización o posición con respecto al objeto (Hunsaker et al., 2007).

Esta divergencia funcional está respaldada por diferentes estudios que han registrado neuronas con propiedades de disparo espacial específicamente en la MPP y no tanto en la LPP (Hargreaves, et al., 2005; Solstad et al., 2008; Moser et al., 2017), y por algunos estudios de comportamiento. En estos estudios, los animales sometidos a lesiones selectivas en la MPP o en la LPP mostraron distintos tipos de deterioro del comportamiento: la lesión en la vía medial causó defectos en las pruebas que requerían aprendizaje espacial (Ferbinteanu et al., 1999), mientras que la lesión en la vía lateral afectó al correcto desarrollo de pruebas relacionadas con el aprendizaje contextual (Hunsaker et al., 2007; Wilson et al., 2013). Estas investigaciones refuerzan la idea de una contribución diferencial de cada vía en procesos de aprendizaje y memoria.

Las sinapsis de EC-DG han sido relacionadas con la Enfermedad de Alzheimer (EA). La EC es un objetivo inicial en el estudio de la EA, ya que se produce una pérdida significativa de neuronas en la L2 de esta corteza en las primeras etapas de la enfermedad (Marcantoni et al., 2014). Las neuronas se ven afectadas selectivamente por el depósito temprano de la proteína beta amiloide ($A\beta$), un fenómeno observado tanto en humanos como en modelos de ratones transgénicos que portan mutaciones de la EA familiar humana (Di Castro y Volterra, 2022). En varios estudios se han observado alteraciones moleculares y funcionales que conducen a una hiperexcitabilidad neuronal y a alteraciones en la plasticidad, existiendo una mayor predisposición a la patología en la LPP (Jiang et al., 2021), que es la vía menos estudiada de ambas, sobre todo con relación a la plasticidad y los posibles mecanismos implicados.

3.1. PLASTICIDAD EN LA CORTEZA ENTORRINAL Y GIRO DENTADO.

En cuanto a los estudios de plasticidad en la sinapsis de EC-DG, varios estudios han demostrado que es relativamente difícil inducir plasticidad sináptica en células granulares del giro dentado maduras pero no en células más tempranas (Lopez-Rojas et al., 2016). Por ejemplo, se ha reportado que la LTD puede ser inducida por una variedad de protocolos de estimulación, siendo el más común el protocolo de estimulación de baja frecuencia (en inglés, *low frequency stimulation*, LFS) a 1-2 Hz aplicado sobre la MPP para inducir una LTD homosináptica; mientras que la LTD heterosináptica también se ha demostrado en las sinapsis de la MPP y la LPP mediante estimulación de alta frecuencia (en inglés, *high frequency stimulation*, HFS) de la otra entrada sináptica (Pöschel y Stanton, 2007). Además, la activación por agonistas de mGluRs también puede inducir diferentes formas de LTD en el DG (Pöschel y Manahan-Vaughan, 2005).

En relación con la LTP, la primera forma de plasticidad que se descubrió en la vía perforante fue en la sinapsis establecida entre la MPP y las células granulares del giro dentado. Se observó *in vivo* una LTP en conejos anestesiados (Bliss y Lomo, 1973) En este estudio, la LTP se indujo utilizando un breve tren de potenciales de acción de alta frecuencia, asegurando así la despolarización pre y postsináptica coincidente. Como resultado, se observó una mejora en la eficacia sináptica (Bliss y Cooke, 2011). Es decir, la LTP se puede inducir en esta sinapsis con un protocolo de alta frecuencia que clásicamente induce una robusta LTP en otras sinapsis (en inglés, *Theta-burst stimulation*, TBS).

4. ASTROCITOS.

El sistema nervioso está formado principalmente por dos tipos de grupos celulares: las neuronas y las células gliales o glía. La glía se puede dividir en: *macroglía*, que incluye células como astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias (éstas tres están localizadas en el Sistema Nervioso Central, SNC) y células de Schwann (en el Sistema Nervioso Periférico, SNP); y *microglía*. En concreto, los astrocitos son el tipo de célula glial más abundante en el SNC de los mamíferos y el interés en su estudio ha aumentado bastante en los últimos años debido a sus

funciones recientemente descubiertas en la formación, maduración, eficacia y plasticidad de las sinapsis (Freeman, 2010). Un desafío importante para la neurociencia es llegar a conocer todas las funciones de los astrocitos y comprender cómo se comunican entre sí y con las neuronas durante el desarrollo para establecer arquitecturas de redes neuronales y astrocíticas apropiadas.

Las propiedades estructurales del citoesqueleto de astrocitos son mantenidas gracias a la red de filamentos intermedios, de la cual el componente fundamental es la proteína ácida fibrilar glial (en inglés, *glial fibrillary acidic protein*, GFAP). El nombre de astrocito viene de la forma estrellada que tienen estos filamentos intermedios del citoesqueleto cuando se ponen de manifiesto en su citoplasma, ya que estas células poseen numerosas prolongaciones celulares que le dan un aspecto estrellado. No obstante, la forma celular real de los astrocitos puede ser muy variable y se clasifican en dos grandes grupos: *protoplásmicos*, localizados en la sustancia gris, tienden a tener contornos más irregulares y emiten muchas prolongaciones que se pueden ramificar varias veces y cuyos extremos se denominan pies terminales; y *fibrosos*, que se encuentran en la sustancia blanca, con prolongaciones mucho más delgadas y casi sin ramificar (Miller y Raff, 1984; Megías et al., 2022). Los astrocitos protoplásmicos están en estrecho contacto con los compartimentos presinápticos y postsinápticos y participan activamente en el desarrollo y la función sináptica en la mayoría de las partes del cerebro. Además, existen algunas células astrogliales especializadas, como las células de Müller en la retina y las células gliales de Bergmann en el cerebelo (Zhou et al., 2019). Es decir, se desafía la visión convencional de que los astrocitos son morfológicamente homogéneos en todo el cerebro; en cambio, muestran diversidad morfológica específica según el circuito y la región que puede contribuir a una interacción espaciotemporal heterogénea de astrocitos y neuronas en diferentes áreas del cerebro.

Los términos “*astrocitosis*”, “*astrogliosis*”, “*gliosis reactiva*”, “*reactividad de astrocitos*” o “*astrogliosis reactiva*”, se han utilizado para describir las respuestas de astrocitos a eventos anormales o inflamatorios que ocurren en el SNC, que incluyen enfermedades neurodegenerativas y desmielinizantes, epilepsia, trauma, isquemia, infección y cáncer. La astroglisis reactiva se podría definir como el proceso mediante el cual, en respuesta a la patología, los astrocitos se involucran en programas molecularmente definidos que implican cambios en la regulación transcripcional, así como remodelaciones bioquímicas, morfológicas, metabólicas y fisiológicas, con el objetivo de reestablecer la homeostasis en el medio (Escartin et al., 2021).

En contraste con el paradigma aceptado clásicamente que afirma que la función cerebral resulta exclusivamente de la actividad neuronal, estudios más recientes sugieren que la función cerebral podría surgir en realidad de la actividad concertada de una red de neuronas y glía. El término “sinapsis tripartita” hace referencia a un concepto de la fisiología sináptica basado en la demostración de la existencia de una comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas (Figura 8). De acuerdo con este concepto, además del clásico flujo de información "bipartito" entre las neuronas presinápticas y postsinápticas, los astrocitos intercambian información con los elementos neuronales sinápticos, respondiendo a la actividad sináptica y, a su vez, regulando la transmisión sináptica (Perea et al., 2009).

Anteriormente, se consideraba que los astrocitos desempeñaban funciones simples de apoyo y soporte para las neuronas, brindando de forma pasiva las condiciones ambientales adecuadas para desarrollar la función neuronal apropiada. Además, debido a que la función neuronal transmite señales eléctricas principalmente y los astrocitos no son excitables eléctricamente (expresan canales iónicos de membrana, pero el nivel de expresión de algunos canales clave es relativamente bajo), los astrocitos no se han tenido en cuenta como células de señalización (Araque y Navarrete, 2010). La evidencia obtenida durante los últimos años ha cuestionado el concepto de los astrocitos como elementos pasivos y, en cambio, indica que los astrocitos desempeñan un papel activo como procesadores de información en el funcionamiento del cerebro. Se sabe que los astrocitos desempeñan funciones claves en numerosos procesos del desarrollo y la fisiología del SNC, como el metabolismo neuronal, la sinaptogénesis, la homeostasis del medio extracelular o el control del flujo sanguíneo cerebral. Además, se ha demostrado gracias al uso de técnicas como la fluorescencia sensible a Ca^{2+} intracelular que los astrocitos muestran una forma de señalización celular basada en variaciones de la concentración de este ion en el citosol en lugar de cambios eléctricos en la membrana (Perea y Araque, 2005).

Más concretamente, los canales dependientes de voltaje expresados por los astrocitos funcionan principalmente como un mecanismo para el mantenimiento homeostático de los niveles extracelulares de iones (Seifert et al., 2006), con implicaciones menores para la señalización celular. Por el contrario, los astrocitos utilizan principalmente el Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplásmico como fuente de Ca^{2+} citoplasmático, que actúa como señal celular. Por tanto, mientras que las neuronas basan su excitabilidad celular en las señales eléctricas generadas a través

de la membrana, los astrocitos basan su excitabilidad celular en las variaciones de la concentración de Ca^{2+} en el citosol. Estas variaciones de Ca^{2+} funcionan como una señal intracelular e intercelular que puede propagarse dentro y entre astrocitos, es decir, a diferentes regiones de la célula y a diferentes células y, con ello, desencadenar respuestas con importantes implicaciones para la función neuronal (Perea y Araque, 2005).

Es decir, los efectos en las variaciones de Ca^{2+} no se encuentran restringidos a un solo astrocito, sino que pueden transmitirse a los astrocitos circundantes creando ondas de Ca^{2+} . Las ondas de Ca^{2+} son una forma de comunicación entre astrocitos y fueron descritas en cultivos de astrocitos, donde se observó que la señal de Ca^{2+} intracelular podía viajar a los astrocitos adyacentes, llegando a recorrer hasta $450 \mu\text{m}^2$ sin que se detectase una disminución en la señal (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991).

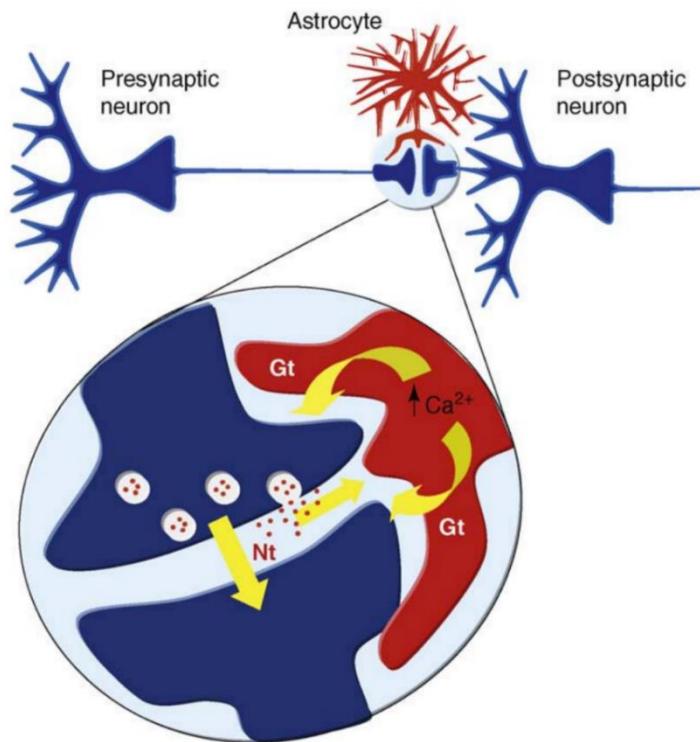


Figura 8. Esquema de la sinapsis tripartita. Ilustración que representa la transferencia de información entre elementos neuronales y astrocitos en la sinapsis tripartita. Los astrocitos responden con aumentos de Ca^{2+} a los neurotransmisores (Nt) liberados durante la actividad sináptica y, a su vez, controlan la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica a través de la liberación de gliotransmisores (Gt) dependientes de Ca^{2+} . Tomado de Perea et al., 2009.

Además de la excitabilidad neuronal, los astrocitos pueden modular la actividad sináptica a través de la activación de receptores pre y postsinápticos gracias a gliotransmisores liberados por astrocitos cercanos. Los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la liberación de gliotransmisores han sido muy debatidos y estudiados (Araque et al., 2014; Shigetomi et al., 2016) y uno de estos mecanismos que liberan sustancias de manera regulada al espacio extracelular es el que depende el complejo proteico SNARE. Varias investigaciones han demostrado que la liberación glial tiene un mecanismo que depende del calcio y de la proteína SNARE (Araque et al., 2000).

Para ayudar a investigar el papel de los astrocitos en la regulación de la transmisión sináptica, se han generado ratones transgénicos inducibles que expresan un dominio SNARE negativo dominante de forma selectiva en los astrocitos con el objetivo de bloquear la liberación de transmisores de estas células gliales (Fujita et al., 2014). En la generación de estos ratones hay dos líneas diferentes (Figura 9): una primera línea contiene el promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que media la expresión del transactivador de tetraciclina (tTA); mientras que la segunda línea tetO.dn-SNARE contiene un dominio dn-SNARE regulado por un operador tetO y una proteína de fluorescencia verde (EGFP). Cuando ambas líneas son cruzadas, el dominio dn-SNARE se expresa específicamente en los astrocitos. Para lograr una regulación temporal inducible y reversible de la expresión del transgén dn-SNARE, los ratones dn-SNARE utilizan el sistema "Tet-Off", en el que el tratamiento con tetraciclina o su análogo doxiciclina (Dox) desactiva la expresión génica. Cuando no se les administra Dox, la expresión del transgén dn-SNARE interfiere con la formación del complejo SNARE, lo que provoca un bloqueo de la exocitosis y una liberación vesicular alterada en los astrocitos (Sultan et al., 2015).

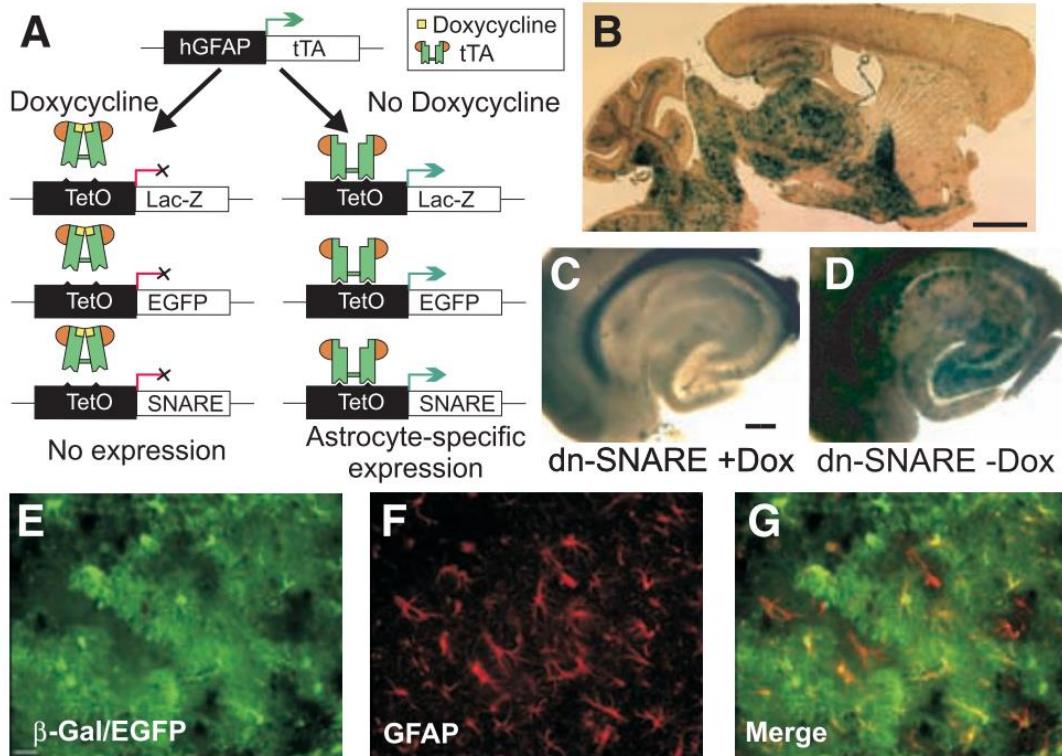


Figura 9. Expresión específica de astrocitos del dominio dn-SNARE. (A) Se generaron dos líneas de animales, hGFAP.tTA y tetO.SNARE. Cuando se cruzan estas líneas, Dox suprime la expresión de SNARE, EGFP y lacZ. (B) Expresión de b-galactosidasa (b-Gal) en una sección parasagital de cerebro de ratón dn-SNARE (barra de escala, 1 mm). (C y D) Las rodajas de ratones dn-SNARE (TDOx) muestran la regulación transgénica por Dox (barra de escala, 200 μm). (E) La fluorescencia de EGFP y b-Gal y (F) la inmunorreactividad de GFAP demuestran la expresión de productos génicos en astrocitos. (G) Imágenes combinadas (E) y (F). Modificado de Sultan et al., 2015.

5. RECEPTORES DE GLUTAMATO.

Glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC de los mamíferos, participando en procesos muy relevantes como la sinaptogénesis, la maduración neuronal y la transmisión sináptica. En concreto, la transmisión glutamatérgica juega un papel determinante en fenómenos de plasticidad sináptica, por ejemplo, participa tanto en la LTP como en la LTD. Una gran cantidad de evidencia indica que alteraciones en la transmisión glutamatérgica pueden desencadenar una serie de enfermedades y daños cerebrales como ataques epilépticos,

enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, enfermedad de Huntington, Parkinson o Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

Los receptores de glutamato se clasifican en dos grandes grupos diferenciados (Figura 10): *ionotrópicos*, canales iónicos regulados por ligando permeable a cationes que participan en la transmisión sináptica rápida del sistema nervioso; y *metabotrópicos*, acoplados a proteínas G, que participan en la transmisión sináptica lenta del sistema nervioso (Coyle, 2006).

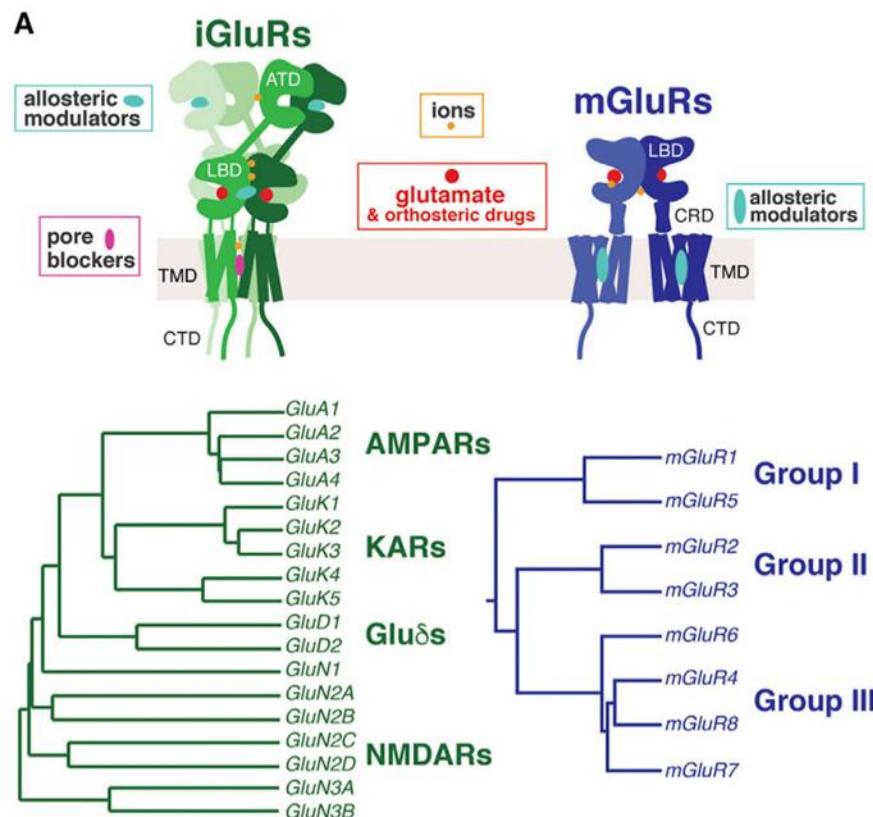


Figura 10. Tipos de receptores de glutamato y su organización estructural. Arriba: organización del dominio de iGluRs (verde) y mGluRs (azul). Abajo: árboles filogenéticos que muestran los grupos de iGluRs y mGluRs y sus subunidades. Modificado de Reiner y Levitz, 2018.

5.1. Receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs).

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) pueden clasificarse en tres grandes grupos en función de la afinidad de los agonistas específicos que los activan (Hollman y Heinemann, 1994):

- Receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico): *AMPAR*; subunidades GluA).
- Kainato (ácido kaínico): *KAR*; subunidades GluK.
- Receptores NMDA (N-metil-D-aspartato): *NMDAR*; subunidades GluN.

Los iGluR se ensamblan como tetrámeros que constan de cuatro subunidades iguales (homómeros) o distintas (heterómeros). La interacción del agonista con el iGluR produce un cambio conformacional en el dominio transmembrana del tetrámero, formando un canal catiónico no selectivo permeable tanto para Na^+ como para K^+ (Traynelis et al., 2010). El canal formado por el receptor NMDA (en inglés, NMDA receptor, NMDAR) permite también el paso de iones de Ca^{2+} , lo que se traduce en un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular cuando el receptor se activa.

5.1.1. Receptores de NMDA.

Los receptores de tipo NMDA conforman un elemento clave en la transmisión excitatoria y la plasticidad sináptica en el sistema nervioso central (Panatier et al., 2006). Además, estos receptores se han visto implicados en mecanismos de excitotoxicidad, enfermedades neurodegenerativas y desórdenes psiquiátricos (Lau y Zukin, 2007).

Los NMDAR son diversos en su composición molecular (subunidades), sus propiedades biofísicas y farmacológicas, su interacción con diferentes moduladores alostéricos y su localización subcelular (Mony et al., 2009) (Figura 11). La composición de subunidades varía entre las regiones del SNC durante el desarrollo y en los estados patológicos (Lau y Zukin, 2007). También hay evidencia de que incluso en sinapsis completamente maduras, el contenido de la subunidad NMDAR cambia según la actividad neuronal (Paoletti et al., 2013).

Se han identificado hasta el momento siete subunidades, que se pueden agrupar en tres grupos dependiendo de la similitud de sus secuencias: la subunidad GluN1, cuatro subunidades GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D), codificadas por cuatro genes distintos, y dos subunidades GluN3 (GluN3A y GluN3B), que también provienen de dos genes diferentes (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004).

Estas subunidades comparten una misma estructura compuesta por cuatro dominios diferentes: el dominio de unión del agonista (ABD), el dominio transmembrana (TMD) formado por tres segmentos de membrana (M1, M3 y M4) y uno (M2) que contiene el poro del canal iónico; el dominio extracelular N-terminal (NTC) y el dominio intracelular C-terminal (CTD) (Paoletti, 2011). Los lazos extracelulares (S1 y S2) forman un dominio de interacción para las moléculas co-agonistas: glicina y D-serina (GluN1 y GluN3) y glutamato (GluN2). Los receptores funcionales de NMDA están compuestos por dos subunidades GluN1 y una combinación de GluN2 y/o GluN3 y son permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , mientras el poro del canal se mantiene bloqueado por Mg^{2+} de forma dependiente de voltaje. En el dominio C-terminal existen sitios de interacción con otras proteínas y sitios de fosforilación, que regulan la localización y actividad de los NMDARs (Chen y Roche, 2009).

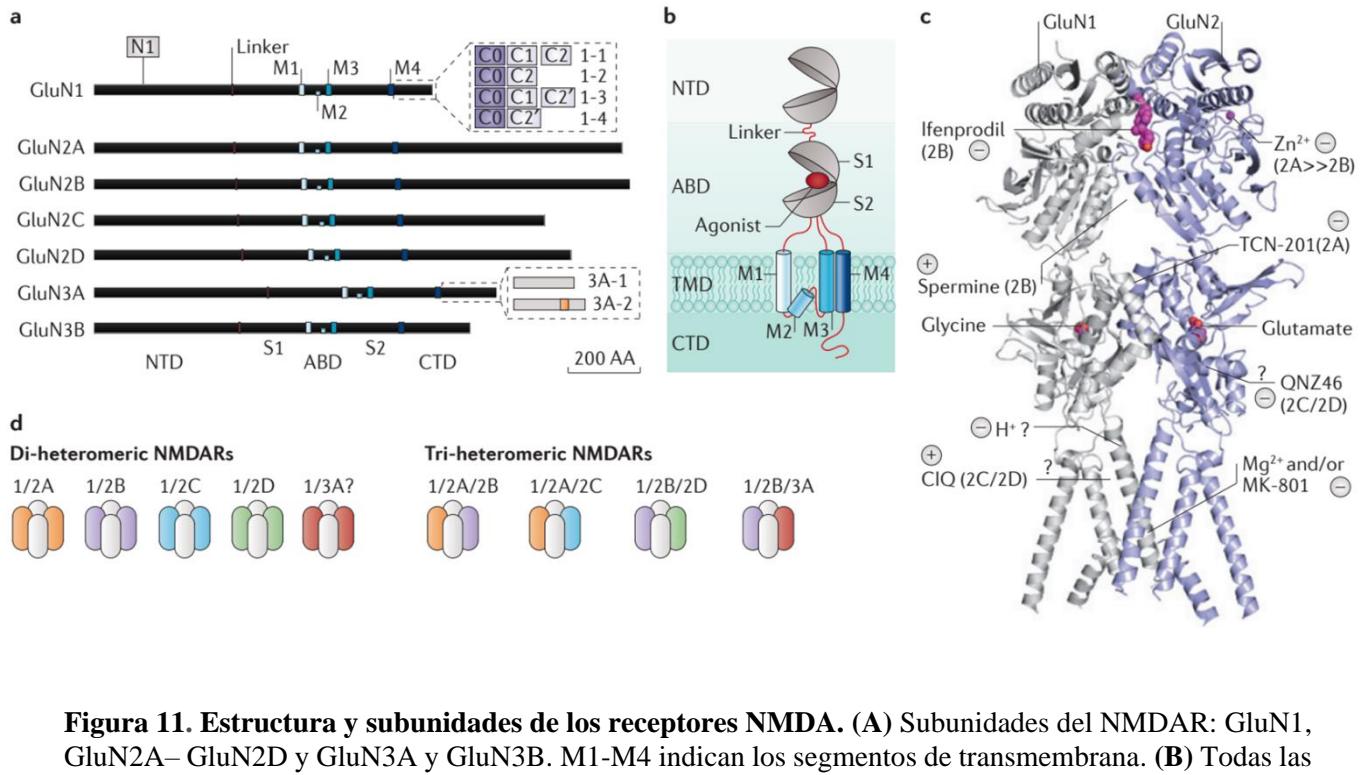


Figura 11. Estructura y subunidades de los receptores NMDA. (A) Subunidades del NMDAR: GluN1, GluN2A–GluN2D y GluN3A y GluN3B. M1-M4 indican los segmentos de transmembrana. (B) Todas las subunidades GluN comparten una estructura que se compone de cuatro dominios distintos. (C) Modelo de un heterodímero GluN1/GluN2B basado en las estructuras cristalinas de rayos X de GluN1/GluN2B. Los signos (+) indican moduladores alostéricos positivos y los signos (-) indican moduladores alostéricos negativos, mientras que los signos de interrogación (?) indican incertidumbre de la localización exacta del sitio de unión. (D) Muestra de las diversas poblaciones de NMDARs diheteroméricos y triheteroméricos que se cree que existen en el SNC. Modificado de Paoletti et., al. 2013.

En cuanto a la participación de los NMDARs en la plasticidad sináptica, algunos de los mecanismos de inducción de plasticidad más frecuentes dependen de la activación de receptores de tipo NMDA que actúan como detectores de coincidencia (Bliss y Collingridge, 2019). La STDP en las sinapsis glutamatérgicas está mediada por las mismas vías de señalización que median la LTP y la LTD clásicas: la LTP y la LTD dependientes de NMDARs (Figura 12), en las que la liberación presináptica y la despolarización postsináptica correlacionadas desencadenan la entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs postsinápticos y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (en inglés, *voltage-dependent Ca^{2+} channels*, VDCC). La inducción de LTP frente a LTD está determinada por la magnitud y el curso temporal del flujo del calcio, que es alto para la LTP y bajo para la LTD (Lisman, 1989; Feldman, 2012;).

En concreto, si un potencial de acción sucede después de la actividad presináptica, el glutamato activa el NMDAR y la despolarización ligera que se produce permite que el Mg^{2+} deje libre el poro del canal del NMDAR, provocando el aumento de Ca^{2+} intracelular y se inducirá la LTP. Por el contrario, si el potencial de acción postsináptico ocurre antes que la activación presináptica, la despolarización asociada desaparecerá y se reducirá la entrada de Ca^{2+} a través de receptores NMDA, induciendo una LTD (Markram et al., 2011). Los principales mecanismos de expresión son postsinápticos, mediante la adición o eliminación de receptores AMPA postsinápticos (AMPAR) y cambios en la conductancia de un solo canal (Malinow y Malenka, 2002), aunque también puede ocurrir expresión presináptica.

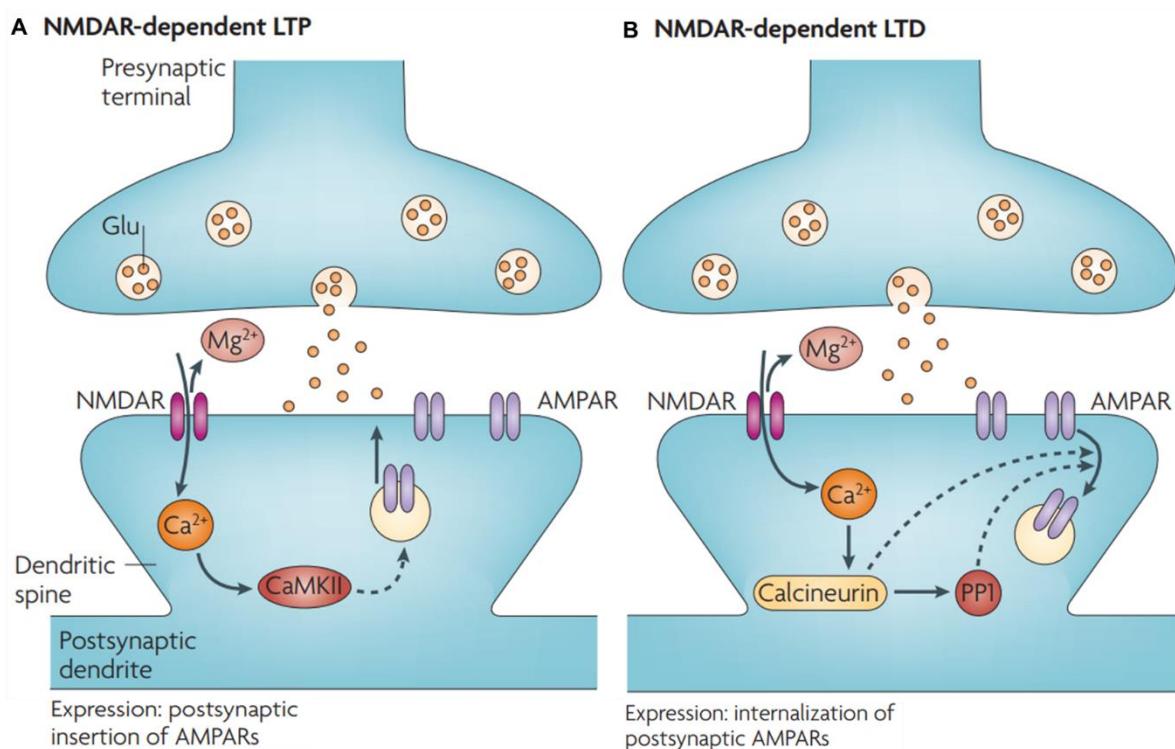


Figura 12. Principales formas de LTP y LTD. (A) La inducción de la LTP dependiente de NMDARs depende de la activación de los receptores de tipo NMDA postsinápticos y de la proteína quinasa II dependiente del complejo Calcio/Calmodulina (CaMKII). El cese del bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje de los NMDARs permite a la sinapsis detectar la coincidencia de la liberación presináptica de glutamato y la despolarización postsináptica. La inserción de receptores de tipo AMPA en la membrana postsináptica es el mecanismo principal que subyace a la expresión de LTP. (B) La LTD dependiente de receptores de tipo NMDA se activa por la entrada de calcio a través de los receptores de tipo NMDA postsinápticos, permitiendo un incremento en la actividad de la proteína fosfatasa Calcineurina y la proteína Fosfatasa 1 (PP1). El mecanismo principal de expresión involucra la internalización de los receptores de tipo AMPA postsinápticos. Modificado de Kauer y Malenka, 2007.

También se ha caracterizado una forma de LTP presináptica en algunas regiones como la sinapsis establecida entre las fibras musgosas y la región CA3 del hipocampo, o la sinapsis cerebelar entre las fibras paralelas y las células de Purkinje. La inducción de la LTP depende de la actividad sináptica repetitiva que da lugar a la entrada de Ca^{2+} presináptico, el cual activa a la adenil ciclase (AC) y esta activación produce un aumento de los niveles de AMPc, activando éste a la proteína quinasa A (PKA). Esto modifica las funciones de Rab3a y RIM1 α permitiendo el incremento de la liberación de glutamato (Kauer y Malenka, 2007). El mecanismo principal de expresión involucra un incremento en la liberación de neurotransmisores presinápticos.

Además de los modelos clásicos, existe una tercera vía de señalización para la LTD en la que los NMDAR postsinápticos no están involucrados y que es dependiente del receptor metabotrópico de glutamato (mGluR) y/o del receptor cannabinoide tipo 1 (CB₁R), (Feldman, 2012).

5.2. Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs).

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) constan de siete dominios transmembrana, característicos de todos los receptores acoplados a proteínas G, que están separados por pequeñas asas intra y extracelulares (Hollman y Heinemann, 1994). Pueden dividirse en tres grupos en función de la homología de su secuencia de aminoácidos (60-70% para un mismo grupo, que se reduce hasta un 40-45% cuando se comparan entre miembros de diferentes grupos), sus propiedades farmacológicas y la vía de transducción de señales que activan:

- *Grupo I*: constituido por receptores mGluR1 y mGluR5. Está asociado a la activación de la fosfolipasa C (en inglés, *phospholipase C*, PLC), generando dos segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) que activa a la proteína quinasa C (en inglés, *protein kinase C*, PKC), e inositol trifosfato (IP₃) que media la liberación de calcio de los depósitos intracelulares (Heidinger et al., 2002).
- *Grupo II*: constituido por receptores mGluR2 y mGluR3. Están acoplados negativamente a la enzima adenilatociclasa (AC) y, por tanto, a la reducción de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Manzoni et al., 1992).

- **Grupo III:** constituido por receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. También están acoplados de forma negativa a la adenilatociclasa, inhibiendo el AMPc (Ladera et al., 2007).

La tercera vía de señalización para la plasticidad, y en concreto para la LTD (Figura 13), es la que no necesita de la participación de los NMDARs postsinápticos, sino que es dependiente de mGluRs y/o del receptor cannabinoides tipo 1 (CB₁R). En este caso, la LTD se expresa a través de una disminución en la probabilidad de liberación del neurotransmisor presináptico. En la LTD dependiente de CB₁R, que está más relacionada con STDP, la activación del calcio postsináptico y mGluR desencadena la síntesis dendrítica de endocannabinoides, que se difunden de forma retrógrada para activar los CB₁R en el terminal presináptico y provocan una disminución duradera en la probabilidad de liberación (Chevaleyre et al., 2006). Otras formas de mGluR-LTD son independientes de CB₁R y se expresan postsinápticamente, pero están menos vinculadas a la STDP (Feldman, 2012).

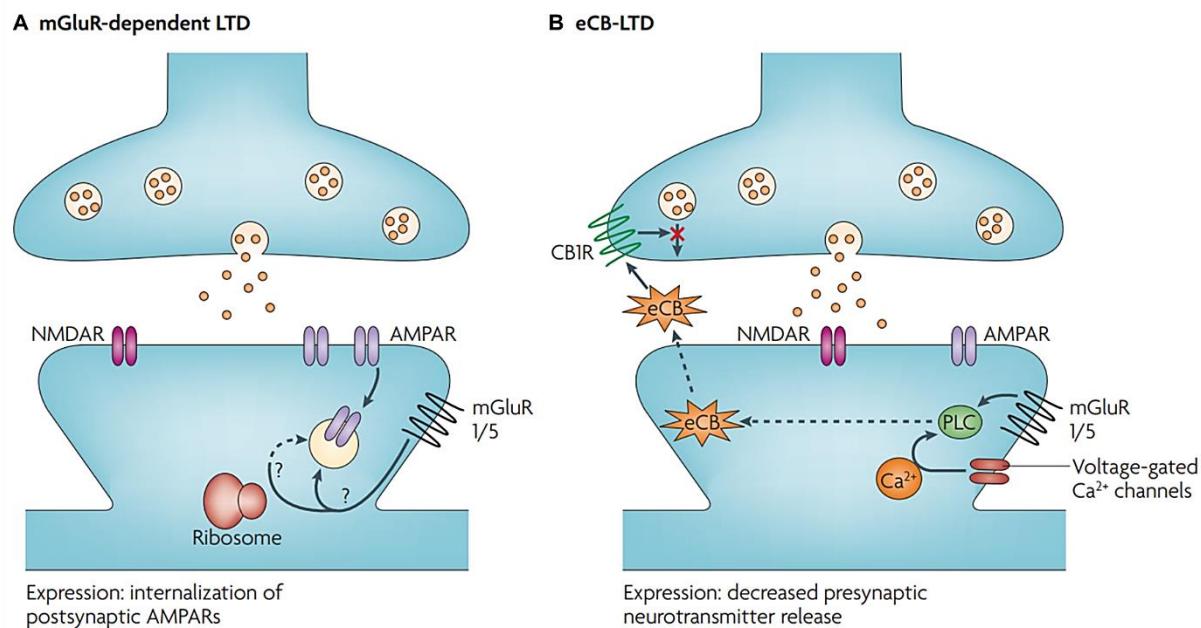


Figura 13. Forma de LTD dependiente de mGluRs y de señalización mediada por eCBs. (A) La activación de mGluR1/5 postsináptico desencadena la internalización de AMPAR postsinápticos, un proceso que en algunas condiciones parece requerir la síntesis de proteínas. (B) La activación de los receptores metabotrópicos de tipo 1 y 5 permite la activación de la Fosfolipasa C (PLC) y/o un incremento de los niveles de Ca²⁺ intracelular, dando lugar a la síntesis de eCBs. Los eCBs son liberados desde la neurona postsináptica y viajan retrógradamente para unirse a los receptores presinápticos cannabinoides de tipo 1 (CB₁). La prolongada activación de los receptores CB₁ deprime la liberación del neurotransmisor. Modificado de Kauer y Malenka, 2007.

II. Objetivos

1. OBJETIVOS GENERALES.

1. Determinar los mecanismos celulares y moleculares que están implicados en los cambios que experimenta la *spike timing-dependent plasticity* (STDP) durante el desarrollo postnatal, en la sinapsis establecida entre las neuronas de la capa 4 y las neuronas de la capa 2/3 de la corteza somatosensorial primaria de ratón.

2. Determinar los mecanismos celulares y moleculares que están implicados en los cambios que experimenta la *spike timing-dependent plasticity* (STDP) durante el desarrollo postnatal en la sinapsis establecida entre las neuronas de las capas 2 y 4 de la corteza entorinal y las del giro dentado del hipocampo de ratón.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar los mecanismos celulares y moleculares que están involucrados en la inducción y la expresión de t-LTD en la sinapsis establecida entre las neuronas de capa 4 y las neuronas de capa 2/3 de la corteza somatosensorial de ratón a edades comprendidas entre P13-27.

2. Determinar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la pérdida de t-LTD en la sinapsis establecida entre las neuronas de capa 4 y las neuronas de capa 2/3 de la corteza somatosensorial de ratón a edades comprendidas entre P28-37.

3. Determinar los mecanismos celulares y moleculares que median la inducción y la expresión de t-LTP en la sinapsis establecida entre las neuronas de capa 4 y las neuronas de capa 2/3 de la corteza somatosensorial de ratón a edades comprendidas entre P38-60.

4. Determinar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la inducción y la expresión de t-LTD en la sinapsis establecida entre las neuronas de las capas 2 y 4 de la corteza entorinal de la vía lateral (LPP) y las granulares del giro dentado a edades comprendidas entre P13-21.

5. Determinar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la inducción y la expresión de t-LTD en la sinapsis establecida entre las neuronas de las capas 2 y 4 de la corteza entorrinal de la vía medial (MPP) y las granulares del giro dentado a edades comprendidas entre P13-21.

III. Materiales y Métodos

1. ANIMALES.

Los experimentos se realizaron en rodajas obtenidas del cerebro de ratones de la cepa C57BL/6 de ambos性 adquiridos de Harlan Laboratories (España) con edades postnatales (P) comprendidas entre 13 y 60 días (P13 - P60, tomando P0 como el día de nacimiento). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar, con un ciclo continuo de luz/oscuridad de 12 horas a temperaturas entre 18-24°C y 40–60% de humedad, sin restricción de alimentos y agua. Se estableció el uso de un mínimo de 6 rodajas de cerebro por cada experimento procedentes de 2-3 ratones diferentes. En algunos experimentos, fue necesario el uso de ratones transgénicos de las mismas edades, (*dn*)-SNARE, en los que la liberación vesicular de gliotransmisores de los astrocitos no funciona (Pascual et al., 2005; Sardinha et al., 2017). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE relativa a la protección del uso de animales con fines científicos y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Pablo de Olavide y el Comité de Ética de la Junta de Andalucía.

2. OBTENCIÓN DEL TEJIDO Y PREPARACIÓN DE RODAJAS.

Los animales fueron anestesiados con isoflurano al 2% y sacrificados por decapitación. El cerebro fue extraído y colocado en una solución artificial “*ringer*” de contenido similar al líquido cefalorraquídeo (ACSF), a una temperatura de 0-4°C y compuesta por (en mM): NaCl, 126; KCl, 3; NaH₂PO₄, 1,25; MgSO₄, 2; CaCl₂, 2; NaHCO₃, 26; y glucosa, 10. El pH se ajustó a 7.2-7.3 y la osmolalidad alrededor de unos 300 mOsM. Una vez extraído el cerebro, se utilizó un vibratomo (Leica VT1000S) para obtener rodajas de cerebro de 350 µm de grosor cortadas horizontalmente y con una inclinación de 45° que contuvieran los barriales de la corteza somatosensorial, como se ha descrito en trabajos previos (Agmon y Connors, 1991; Rodríguez-Moreno et al., 2013; Banerjee et al., 2014). En los experimentos de EC-GC, la orientación de corte fue horizontal. Las rodajas se recuperaron a temperatura ambiente, al menos durante 1 hora antes de comenzar los registros electrofisiológicos, en una cámara con ACSF (95% O₂/5% CO₂) oxigenando continuamente (ver ejemplo en la Figura 14). Para los registros, las rodajas se colocaron en un microscopio (Leica

DM6/DM6000 CFS) y posteriormente se localizó la zona a registrar (L4-L2/3 de la corteza somatosensorial primaria o MPP/LPP-GC, según proyecto).

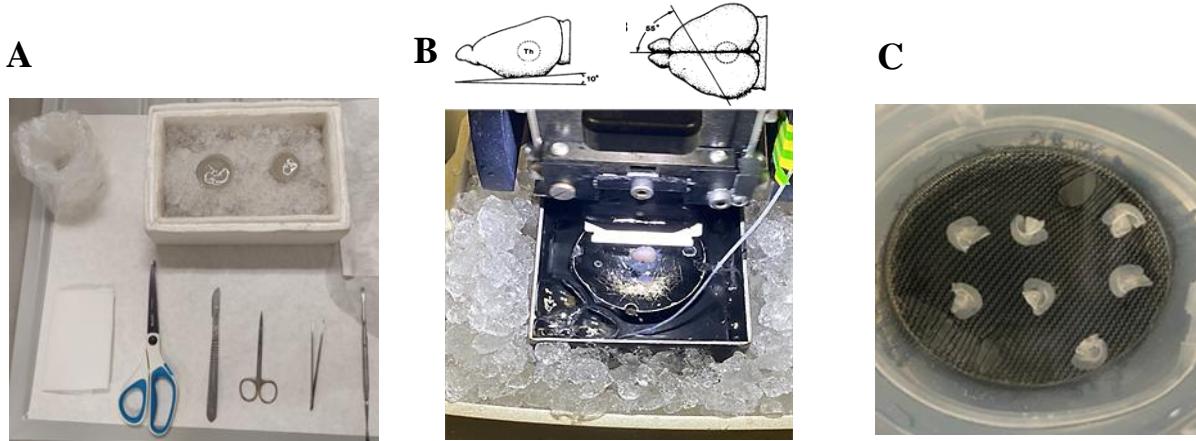


Figura 14. Ejemplo de obtención del tejido y preparación de rodajas para los experimentos de L4-L2/3. (A) Instrumental utilizado para la extracción del cerebro. (B) Ángulo de corte (tomado de Agmon y Connors, 1991) y vibratomo Leica VT 1000S donde se fijó el cerebro para conseguir rodajas de 350 μm de grosor. (C) Cámara donde se mantuvieron las rodajas recuperándose y oxigenando de forma continua.

2.1. Soluciones.

Se utilizaron fundamentalmente dos tipos de soluciones fisiológicas: extracelular e intracelular.

La solución extracelular (*ringer*) se prepara a diario. Esta solución es necesaria para permitir la recuperación de las rodajas y mantener la viabilidad de las mismas durante la realización de los registros electrofisiológicos. La solución *ringer* se preparó a partir de dos tipos de soluciones o “stocks”: 100 ml de stock I (solución con pH ácido) y 110 ml de stock II (solución con pH básico). En las siguientes tablas se detalla la composición de cada uno de los stocks:

STOCK I

Sustancia	Ref. SIGMA	Peso molecular	mM	g/L 1x	g/L 10x
NaCl Sodium Chloride	S7653- 1KG	58.44	126.00	7.363	73.63
KCl Potassium Chloride	P9541- 500G	74.56	3.00	0.224	2.24
NaH ₂ PO ₄ Sodium phosphate monobasic dyhidrate	71505- 250G	156.01	1.25	0.195	1.95
MgSO ₄ ·7H ₂ O Magnesium sulfate heptahydrate	63138- 250G	246.50	2.00	0.493	4.93
Ca ₂ Cl ₂ ·2H ₂ O Calcium Chloride dihydrate	223506- 500G	147.00	2.00	0.294	2.94
Glucosa	G8270- 1Kg	180.20	10.00	1.802	18.02

Tabla 1. Composición de la solución STOCK I.

STOCK II

Sustancia	Ref. SIGMA	Peso molecular	mM	g/L 1x	g/L 10x
NAHCO ₃ Sodium bicarbonato	S6297-1Kg	84.01	24.00	2.016	20.162

Tabla 2. Composición de la solución STOCK II.

La solución intracelular utilizada para los registros con la técnica de patch-clamp es de K-Gluconato (current-clamp, pH 7.2-7.3, 290 mOsM) cuya composición es:

Sustancia	Prov./Código	Peso molecular	mM	Peso (mg) para 50 mL
C ₆ H ₁₁ KO ₇ Potassium D-gluconate	SIGMA G4500-500g	234.25	110 mM	1288.375
C ₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S HEPES Minimun 99.5% titration	SIGMA H3375-500g	238.30	40 mM	476.6
ATP-Mg	SIGMA A9187-1g	507.18	4 mM	101.436
GTP Sodium Salt	SIGMA G8877-100 mg	523	0.3 mM	7.845
NaCl Sodium Chloride	AMRESCO (SIGMA)	58.44	4 mM	11.688

Tabla 3. Composición de la solución de interna.

3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Se obtuvieron registros electrofisiológicos de potenciales postsinápticos excitadores evocados (eEPSP) con la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa (*whole-cell*) a partir de células piramidales de capa 2/3 en los experimentos de corteza y de células granulares del giro dentado en los experimentos de EC-DG, a una temperatura cercana a los valores fisiológicos (30-34 °C) y utilizando un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices) en el modo *current-clamp*. Para este tipo de registros, se utilizaron pipetas de borosilicato fabricadas con un puller P-97 (Sutter Instruments), cuya resistencia fue del orden de 4-7 MΩ cuando se llenaron con la solución interna descrita anteriormente. La visualización de las células se realizó mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial infrarroja, usando un objetivo de inmersión en agua de 25x con una magnificación adicional 1.25x.

Para estudiar la plasticidad, los potenciales postsinápticos excitadores (EPSPs) se evocaron alternativamente utilizando dos electrodos de estimulación monopolares, electrodo de la ruta test o pareada (S₁) y electrodo de la ruta control o no pareada (S₂), a una frecuencia de 0.2 Hz. Estos electrodos de estimulación se colocaron a 200-400 μm de distancia del soma celular en el caso de los experimentos de corteza somatosensorial, mientras que para los experimentos de corteza entorrinal y giro dentado se colocaron en el tercio distal y medial del árbol dendrítico de las células granulares del giro dentado, correspondientes a las vías perforantes lateral y medial respectivamente, a 200-300 μm del soma. Se evocaron los EPSP mediante breves pulsos de corriente (200 μs, 0.1-0.2 mA), como se ha descrito anteriormente (Andrade-Talavera et al., 2016). La estimulación se ajustó para obtener una amplitud máxima de los eEPSP de aproximadamente 3-5 mV en condiciones control. La independencia de los electrodos de estimulación (S₁ y S₂) se aseguró por la falta de facilitación cruzada de los eEPSP cuando ambas vías se activaron alternativamente a intervalos inter-estímulo de 50 ms de separación. La plasticidad se evaluó como cambios en la magnitud de la pendiente de los eEPSP tras la aplicación de los protocolos de plasticidad.

Para realizar los experimentos se registraron células con un potencial de membrana menor o igual a -55 y se les aplicó un protocolo de pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes (*step protocol*). Se tomó como criterio para excluir células un cambio en la resistencia en serie de

más del 15% durante el experimento. Los registros se realizaron filtrando la señal a 3 kHz y los datos se adquirieron a 10 kHz.

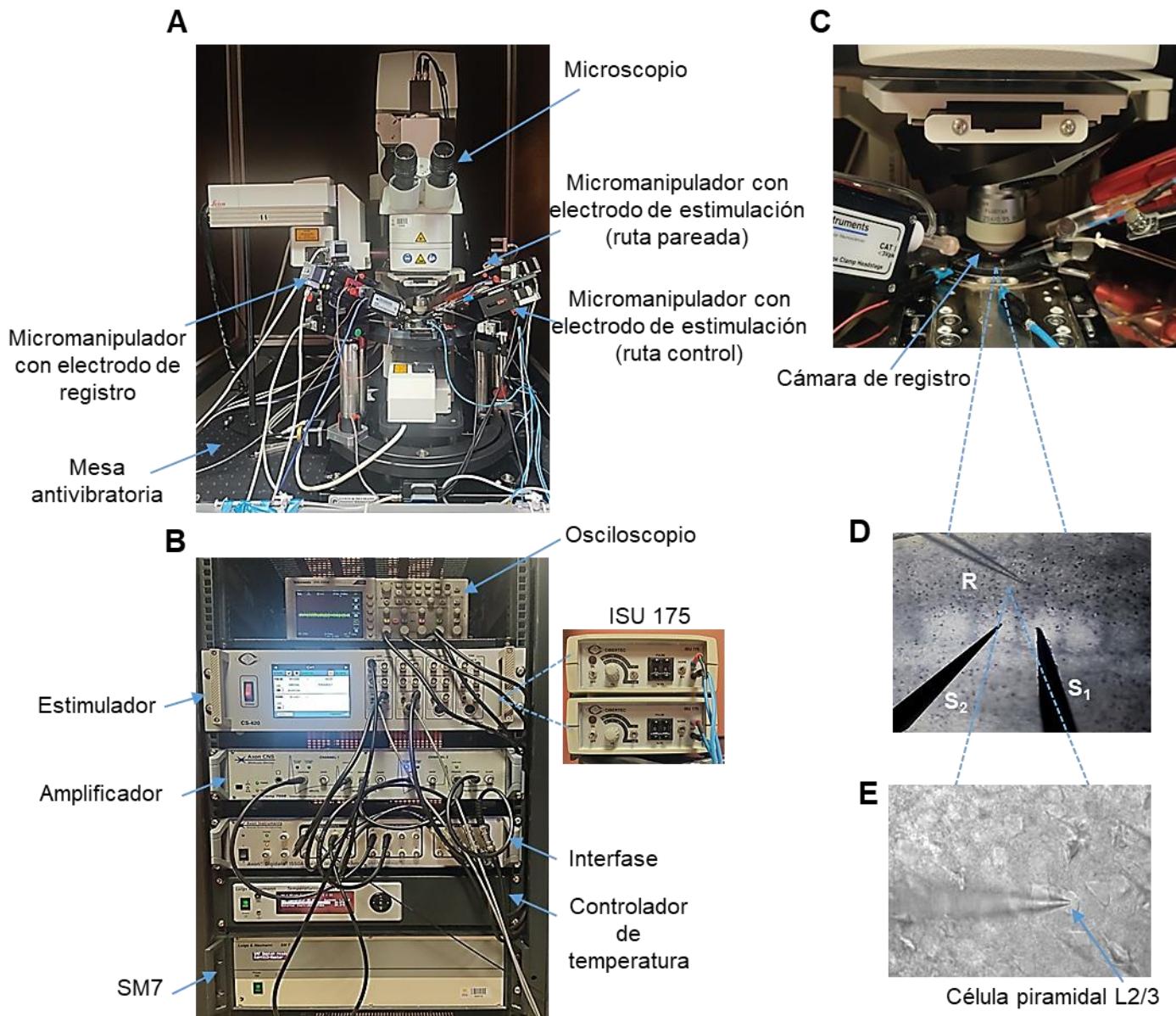


Figura 15. Elementos del setup de registro. (A) Microscopio Leica DM6/DM6000 CFS con sus diferentes componentes. (B) Equipos utilizados para la realización de experimentos. (C) Cámara de registro. (D) Ejemplo de visión ampliada usando un objetivo 10x de L4-L2/3 de la corteza somatosensorial primaria con los electrodos de estimulación y registro. (E) Ejemplo de imagen de la pipeta de registro sobre una célula piramidal de L2/3 con un objetivo de 25x.

4. PROTOCOLOS EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS.

Para el estudio de la *spike timing-dependent plasticity* (STDP) o plasticidad dependiente del orden y el intervalo temporal entre potenciales de acción, se colocaron dos electrodos de estimulación (S₁: electrodo test o de la ruta pareada y S₂: electrodo control o de la ruta no pareada) de tal forma que se evitaba que ambos electrodos estimularan los mismos conjuntos de fibras. Los eEPSP fueron provocados alternativamente en ambas rutas a una frecuencia de 0.2 Hz mediante breves pulsos de corriente, como ya se ha descrito en el apartado anterior. En concreto, el protocolo de STDP utilizado en todos los experimentos de plasticidad fue un protocolo típico de depresión de larga duración -*spike timing-dependent long term depression* (t-LTD)- y se aplicó de la siguiente manera: en S₁ un pulso presináptico (provocado por un pulso de corriente bajo; 5 ms, 0.1-0.5 pA) se pareó con un potencial postsináptico 100 veces con un intervalo temporal de -18 ms (protocolo *post-pre*), mientras que S₂ no fue pareada.

Uno de los métodos indirectos que puede sugerir si el mecanismo de acción de los fenómenos observados es de naturaleza presináptica o postsináptica es el protocolo de facilitación por pares de pulsos (PPF) y en estos experimentos se obtuvieron datos de PPF. Se evocaron dos EPSP durante 30 segundos a la frecuencia basal (0.2 Hz) con un intervalo entre estímulos de 40 ms, tanto al comienzo como al final del experimento, es decir, 30 minutos después del final del protocolo de STDP.

El proceso seguido para la realización de los experimentos puede resumirse de la siguiente forma: tras finalizar el protocolo PPF al inicio del experimento y previo a la inducción de la STDP, la magnitud de la pendiente de los eEPSP fue monitorizada para establecer una línea base estable de 10 minutos de duración estimulando a una frecuencia de 0.2 Hz. Después de esto, se aplicó el protocolo de t-LTD o protocolo *post-pre* ($\Delta t = -18$ ms), como se ha descrito previamente. Finalmente, la pendiente de los eEPSP fue monitorizada durante al menos 30 minutos después de la inducción de la t-LTD a 0.2 Hz, manteniendo constante la estimulación. Tras ello, se volvió a aplicar el protocolo PPF (Figura 16).

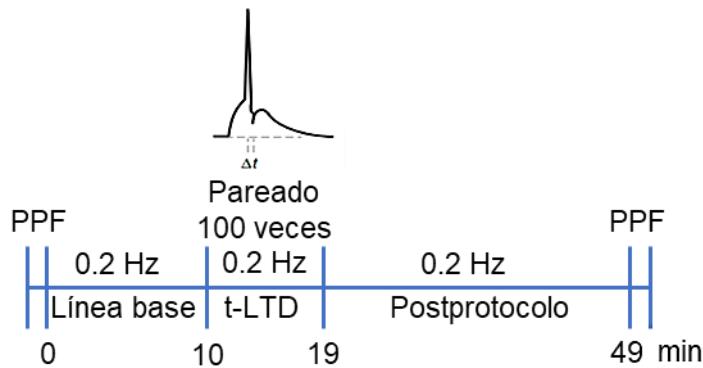


Figura 16. Esquema del protocolo utilizado para la inducción de la t-LTD y curso temporal de los experimentos. Se muestra el protocolo *post-pre* con el intervalo temporal entre el pico de la espiga postsináptica y el comienzo de los eEPSP de 18 ms; así como el curso temporal de los experimentos. Se registraron eEPSPs a una frecuencia de 0.2 Hz y tras una línea basal estable de 10 minutos, se aplicó el protocolo *post-pre* (100 pulsos) a la misma frecuencia y una vez finalizado el protocolo se monitorizaron los EPSP durante al menos 30 minutos. Se obtuvieron datos de PPF tanto al inicio (antes de establecer la línea basal) como al final del experimento (al menos 30 minutos después del final de la aplicación del protocolo de plasticidad).

En algunos experimentos, durante la inducción de la t-LTD se emplearon “puffs” o aplicaciones locales de glutamato utilizando un Picospritzer (Parker Hannifin). Para este propósito, el glutamato se disolvió en ACSF y se aplicó sobre un astrocito cercano a la célula bajo registro, utilizando una pipeta con una presión de 10 psi durante 50-200 ms. La actividad neuronal se registró antes y después de la inducción de la t-LTD.

5. FARMACOLOGÍA.

Los siguientes compuestos se adquirieron de Sigma Aldrich: BAPTA (20 mM, N.º Cat. A4926), CPA (60 nM, N.º Cat. 119135), GDP β S (1 mM, N.º Cat. G7637) y cloruro de Zinc (300 nM, N.º Cat. 208086), así como los compuestos para ASCF y la solución de current-clamp; y de Tocris Bioscience: (+)-MK-801 maleate (500 μ M, N.º Cat. 0924), D-AP5 (50 μ M, N.º Cat. 0106), 8- CPT (2 μ M, N.º Cat. 6137), cPTIO (100 μ M, N.º Cat. 0772), ácido L-glutámico o L-glutamic acid en inglés (100 μ M, N.º Cat. 0218), LY367385 (100 μ M, N.º Cat. 1237), LY341495 (100 μ M, N.º Cat. 1209), PPDA (10 μ M, 2530), Ro 25-6981 (0.5 μ M, N.º Cat. 1594), AM251 (3 μ M, Cat. No. 1117), THL (5 μ M, Cat. No. 3540), L-NAME (100 μ M N.º Cat. 0665), DETA NONOate (5 mM, N.º Cat. 6077), MPEP (20 μ M, N.º Cat. 1212), Nimodipina (10 μ M, N.º Cat. 0600),

Thapsigargina ($10 \mu\text{M}$, N.º Cat. 1138). Los compuestos se disolvieron en agua destilada excepto 8-CPT, PPDA, Nimodipina y Thapsigargina que se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO).

Dependiendo de las necesidades del experimento, estos compuestos fueron aplicados en el baño para observar su efecto sobre la transmisión sináptica o la plasticidad o se introdujeron en la pipeta de registro para tratar directamente a la célula postsináptica o al astrocito.

6. ANÁLISIS DE LOS DATOS.

El análisis de los datos se realizó con el software Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Para esto, se midió la pendiente de los eEPSP de los últimos 5 minutos de la línea base (min 5-10 del experimento) y se normalizó el promedio para estimar los cambios en la eficacia sináptica, comparando estos 5 minutos finales de la línea base con los últimos 5 minutos posteriores al protocolo (min 46-50 del experimento).

En cuanto a las aproximaciones indirectas para determinar si los mecanismos involucrados en la inducción de la t-LTD fueron de naturaleza presináptica o postsináptica, se analizaron los siguientes parámetros:

- Para la facilitación por pares de pulsos (PPF), se calculó la ratio de respuesta por pares de pulsos (PPR) expresada como la pendiente de los eEPSP del segundo pulso dividida por la pendiente de los eEPSP del primero.
- También se realizó un análisis del coeficiente de variación, CV (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008) a partir de las pendientes de los eEPSP de la línea base y de los eEPSP posteriores al final del protocolo de plasticidad (postprotocolo) como se describió anteriormente (Sjöström et al., 2003; Falcón-Moya et al., 2020). El CV está representado por la desviación estándar (σ) de un conjunto de respuestas sinápticas evocadas divididas por su media (μ) tomadas durante un período de tiempo determinado. Por lo general, en la mayoría de los estudios se representa gráficamente como $1/\text{CV}^2$ frente a la media (μ_2/μ_1) (Figura 17).

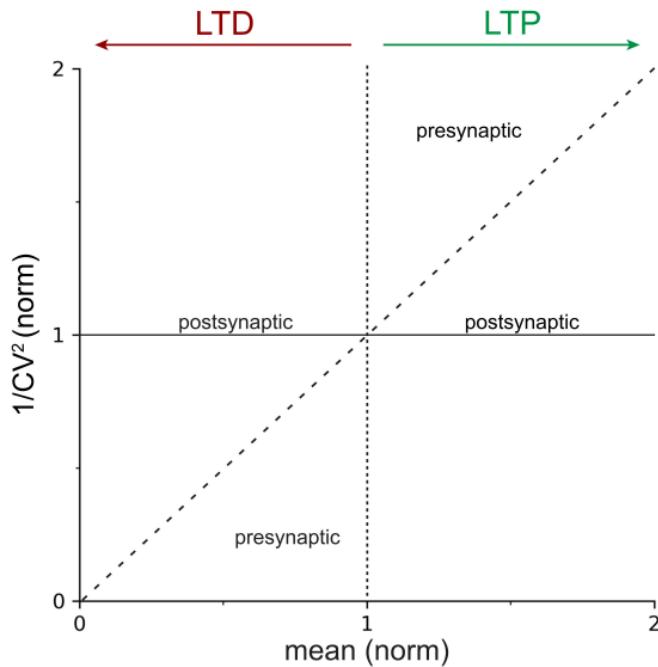


Figura 17. Interpretación del CV. Tomado de Brock., et., al. 2020). La línea diagonal unitaria en la gráfica de $1/CV^2$ frente μ es una línea de demarcación práctica entre la expresión presináptica y la postsináptica.

Todas las gráficas se realizaron utilizando el software SigmaPlot 14.0., mientras que los análisis estadísticos se obtuvieron del software GraphPad Prism 9.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico de los datos de todos los experimentos, se realizó la prueba de normalidad e igualdad de varianzas de Shapiro-Wilk, con un intervalo de confianza del 95%, para determinar si los conjuntos de datos adoptan o no una distribución normal y en función del resultado elegir los test estadísticos más apropiados. Algunos de los grupos de datos de los experimentos de L4-L2/3 de corteza somatosensorial no siguen una distribución normal, por lo que se han utilizado pruebas no paramétricas. Para cualquier comparación entre dos grupos se aplicó, según correspondiera, la prueba U de Mann-Whitney (dos grupos independientes) o la prueba T de Wilcoxon (una variable continua de la misma muestra medida en diferentes tiempos). Para comparaciones múltiples con el mismo control, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Sin

embargo, los datos de los experimentos de corteza entorrinal y giro dentado sí adoptan una distribución normal y por ello se han utilizado pruebas paramétricas. Para las comparaciones entre dos grupos se aplicó la prueba de T de Student: mientras que, para las comparaciones múltiples con el mismo control, se aplicó el análisis de varianza unidireccional (en inglés, *One-way Anova*) seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak. Los datos se expresaron como la media ± el error estándar y los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. El nivel de significancia estadística se indica con símbolos (*) sobre los histogramas: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

IV. Resultados

Capítulo I: *Corteza somatosensorial*

CORTEZA SOMATOSENSORIAL.

1. t-LTD en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial primaria de ratón.

En primer lugar, se realizaron estudios de plasticidad sináptica en la corteza somatosensorial primaria de ratón, en la sinapsis establecida entre las células de la capa 4 (L4) y las células piramidales de las capas 2/3 (L2/3) como se ha descrito previamente (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2011; 2013). Se monitorizaron los eEPSP usando la técnica de *patch-clamp* en su configuración de *whole-cell* o célula completa y se indujo *spike timing-dependent LTD* (t-LTD) en rodajas de animales P13-27. Cuando se aplicó un protocolo *post-pre* ($At = -18$ ms) a 0.2 Hz pareando 100 veces (Figura 18A) se observó una clara t-LTD ($68 \pm 5\%$, $n = 8$; Figura 18B, C), mientras que la ruta no pareada se mantuvo sin cambios, es decir, no se indujo ningún tipo de plasticidad ($101 \pm 6\%$, $n = 8$; Figura 18 B, C).

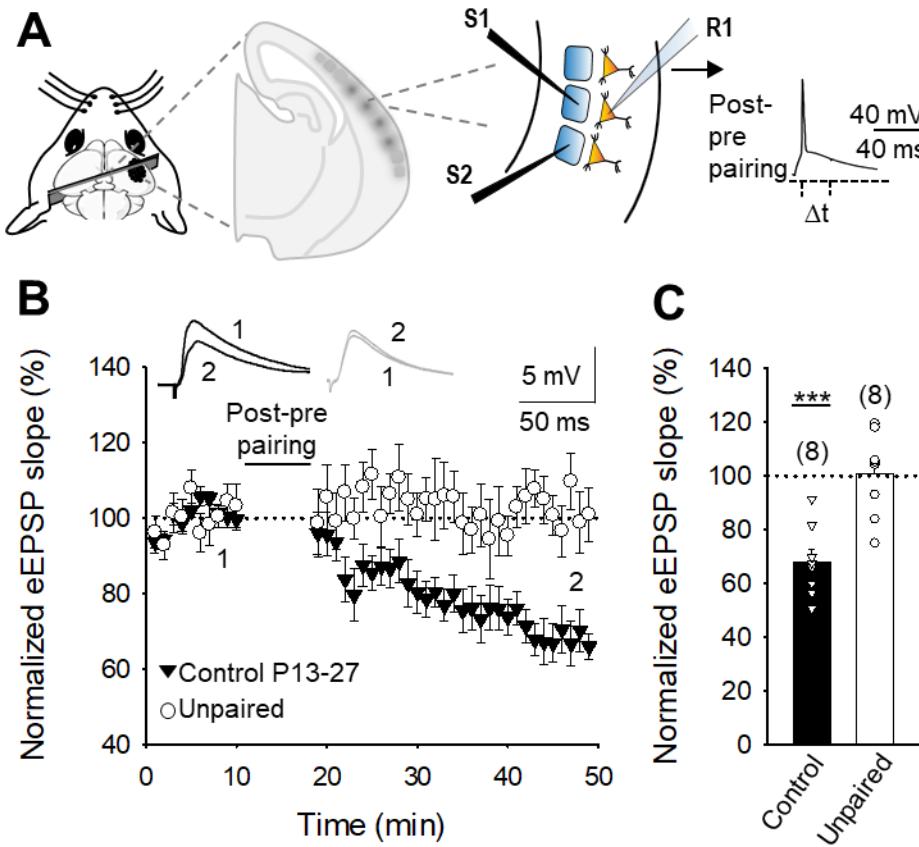


Figura 18. t-LTD ($\Delta t = -18$ ms) en las sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial primaria a la edad de P13-27. (A) A la izquierda, esquema que muestra la configuración experimental general (S₁: electrodo de estimulación de la ruta test o pareada; S₂: electrodo de estimulación de la ruta control o no pareada; R₁: electrodo de registro). A la derecha, protocolo utilizado (donde Δt = tiempo entre el inicio de los eEPSP y el potencial de acción). (B) Un protocolo post-pre indujo t-LTD. Se muestran las pendientes de los eEPSP monitorizadas para la ruta pareada (triángulos negros) y para la ruta control o no pareada (círculos blancos). Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 minutos después de finalizar el protocolo de plasticidad (2). La depresión sólo se observó en la ruta pareada. (C) Los histogramas muestran el resumen de los resultados expresados como la media y el error estándar. Entre paréntesis se indica el número total de rodajas. Cada símbolo representa una rodaja individual. Test de U de Mann–Whitney: ***p < 0.001.

Seguidamente, se estudió el perfil de desarrollo con la edad de esta forma de t-LTD y se observó que la t-LTD se puede inducir hasta P27 ($63 \pm 4\%$ a P13-19, $n = 6$; $68 \pm 8\%$ a P20-27, $n = 6$; Figura 19A, B), como se ha descrito anteriormente (Banerjee et al., 2009) desapareciendo durante la cuarta y quinta semana de desarrollo ($104 \pm 7\%$ a P28-37, $n = 7$; Figura 19A, B). Para determinar si cambios en el intervalo de tiempo entre la actividad presináptica y la postsináptica podrían provocar la pérdida de plasticidad durante el desarrollo, se repitieron los experimentos utilizando dos intervalos de tiempo adicionales (25 y 10 ms) entre la actividad postsináptica y la presináptica como protocolo para inducir la t-LTD. Tal y como ocurrió a -18 ms, se observó una t-LTD pronunciada en animales P13-27 con los intervalos de -25 ms ($71 \pm 3\%$, $n = 6$) y -10 ms ($71 \pm 5\%$, $n = 8$). Sin embargo, la t-LTD se perdió a la edad de P28-37 en ambos casos (-25 ms: $95 \pm 3\%$, $n = 7$; -10 ms: $103 \pm 8\%$, $n = 7$; Figura 18C, D). Por lo tanto, esta forma de t-LTD parece estar relacionada con un período específico del desarrollo, ya que no puede ser inducida a partir del final de la cuarta semana de crecimiento con ninguna de las variaciones en la ventana de tiempo que fueron utilizadas.

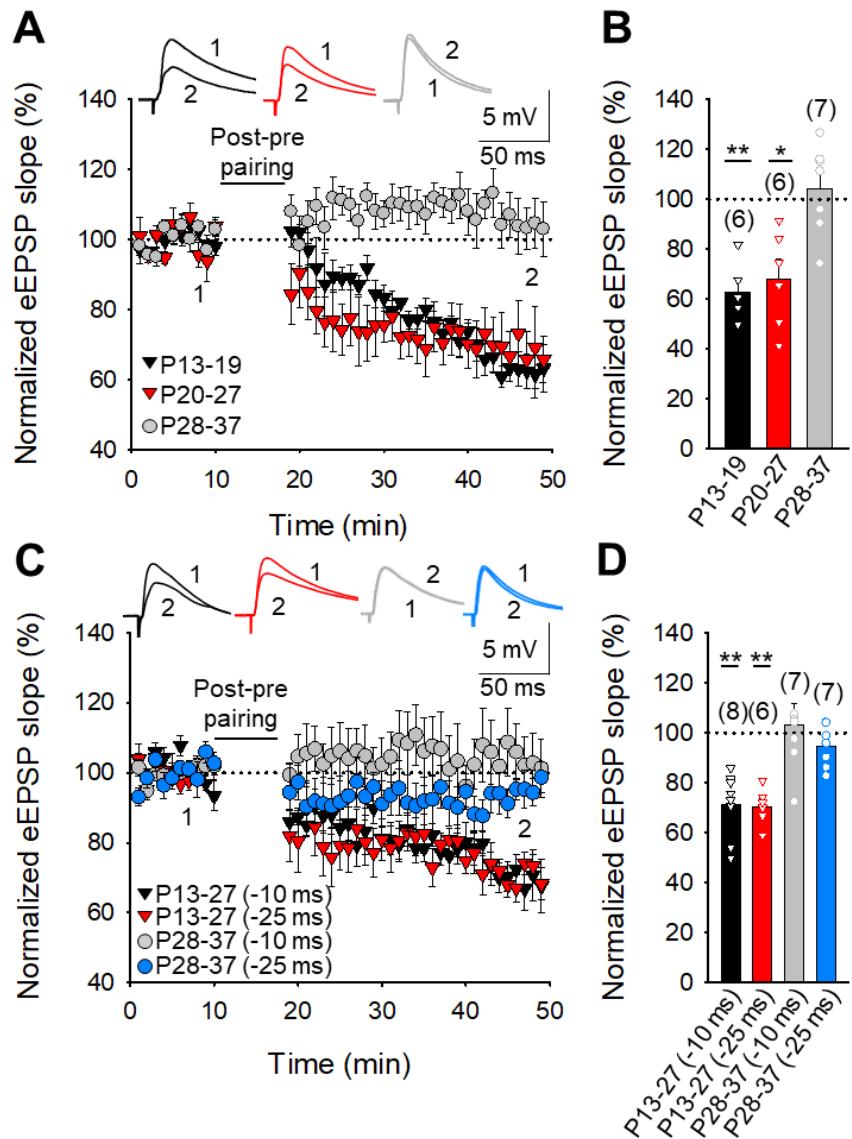


Figura 19. La t-LTD en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial está presente a P13-27 y se puede inducir a diferentes tiempos entre la actividad postsináptica y presináptica, desapareciendo durante la cuarta semana de desarrollo. (A) Curso temporal de los eEPSP para la t-LTD en animales P13-19 (triángulos negros), P20-27 (triángulos rojos) y P28-37 (círculos grises). Ejemplos de los trazos de los eEPSP antes (1) y 30 min después del protocolo de plasticidad (2). La pérdida de la t-LTD no es debida a un cambio en la ventana de tiempo utilizada para inducirla. Se usaron diferentes tiempos entre la actividad presináptica y la postsináptica que fueron más cortos (-10 ms) y más largos (-25 ms) que -18 ms. En ambos casos, la t-LTD es evidente a P13-27 y se pierde por completo a P28-37. (C) Se muestran los eEPSP monitorizados a P13-27 (triángulos negros y rojos) y a P28-37 (círculos grises y azules) en ambos intervalos temporales. (B, D) Resumen de resultados. Las barras representan la media y el error estándar. El número de rodajas aparece indicado entre paréntesis. Test de U de Mann-Whitney: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2. La pérdida durante el desarrollo de la t-LTD no requiere de inhibición GABAérgica, pero implica un incremento en la inhibición mediada por la activación de los receptores de adenosina de tipo A₁.

La inhibición GABAérgica se ha visto involucrada en procesos de plasticidad (Paulsen y Moser, 1998), y se conoce que aumenta con el neurodesarrollo (Banks et al., 2002). Se ha demostrado que está implicada en los cambios que ocurren durante el desarrollo en la inducción de la LTP tanto en el hipocampo (Meredith et al., 2003) como en la corteza auditiva (Chun et al., 2013); y que puede mediar el cierre de la ventana de la LTD en la corteza visual (Hensch, 2005).

Para estudiar si la inhibición GABAérgica podría explicar la pérdida que se ha visto de esta forma de LTD durante el desarrollo, se repitieron los experimentos a la edad de P28-37 en presencia de Bicuculina (10 µM) -antagonista de los receptores de GABA_A-, y posteriormente en presencia de SCH50911 (20 µM) -antagonista de los receptores de GABA_B. Se observó que la t-LTD que ya no estaba presente en condiciones control ($96 \pm 4\%$, n = 8; Figura 20A, B) se seguía perdiendo bajo estas nuevas condiciones experimentales (Bicuculina: $92 \pm 8\%$, n = 7; SCH50911: $120 \pm 6\%$, n = 7; Figura 20A, B). Estos datos indican que la inhibición GABAérgica no recupera la pérdida de la t-LTD que se produce al final de la cuarta semana de desarrollo en las sinapsis de L4-L2/3 de la corteza somatosensorial primaria. Del mismo modo, la presencia de estos compuestos no afectó a la inducción de la t-LTD a P13-27 (t-LTD control: ($63 \pm 4\%$, n = 9; Bicuculina: $72 \pm 5\%$, n = 6; SCH50911: $79 \pm 6\%$, n = 8; Figura 20C, D).

Por otra parte, se ha descrito la adenosina participa en procesos de plasticidad sináptica en el hipocampo adulto (Arai et al., 1990; De Mendonça y Ribeiro, 1994; Rex et al., 2005; zur Nedden et al., 2011); así como que la concentración extracelular de la adenosina aumenta durante el desarrollo cerebral (Sebastião et al., 2000; Rex et al., 2005; Kerr et al., 2013) y que este aumento puede afectar a la eficacia sináptica y a la t-LTD. En el hipocampo, recientemente se descubrió que la adenosina activa receptores de tipo A₁ de adenosina (A₁Rs) cerrando las ventanas de plasticidad en la sinapsis CA3-CA1 (Pérez-Rodríguez et al., 2019).

Para determinar si en la corteza somatosensorial la inhibición mediada por la activación de los receptores de adenosina tipo 1 aumenta con la maduración cerebral, se evaluó el efecto del antagonista de los A₁Rs 8-CPT (2 μM) sobre la pendiente de los eEPSP en los dos intervalos de edad estudiados: P13-27 y P28-37. Como resultado, se observó que el antagonista 8-CPT (2 μM) no afectó a la inducción de la t-LTD a P13-27 (61 ± 7 %, n = 7 frente a 63 ± 4 %, n = 9 sin 8-CPT; Figura 20C, D) pero sí fue capaz de recuperar la t-LTD que se había perdido a P28-37 (80 ± 7 %, n = 8 vs 106 ± 6 %, n = 8 en rodajas no tratadas con 8-CPT; Figura 20A, B).

Al activar los A₁Rs presinápticos, la adenosina ejerce un potente efecto inhibidor sobre la transmisión sináptica glutamatérgica (Dunwiddie y Masino, 2001). Así, la pérdida de la t-LTD a la edad de P28-37 podría deberse a una inhibición de la liberación de glutamato mediada por la activación presináptica de A₁Rs, como recientemente se ha descrito en el hipocampo (Pérez-Rodríguez et al., 2019). Es decir, la activación de los A₁Rs presinápticos por adenosina parece deprimir la liberación de glutamato y prevenir la inducción de la t-LTD.

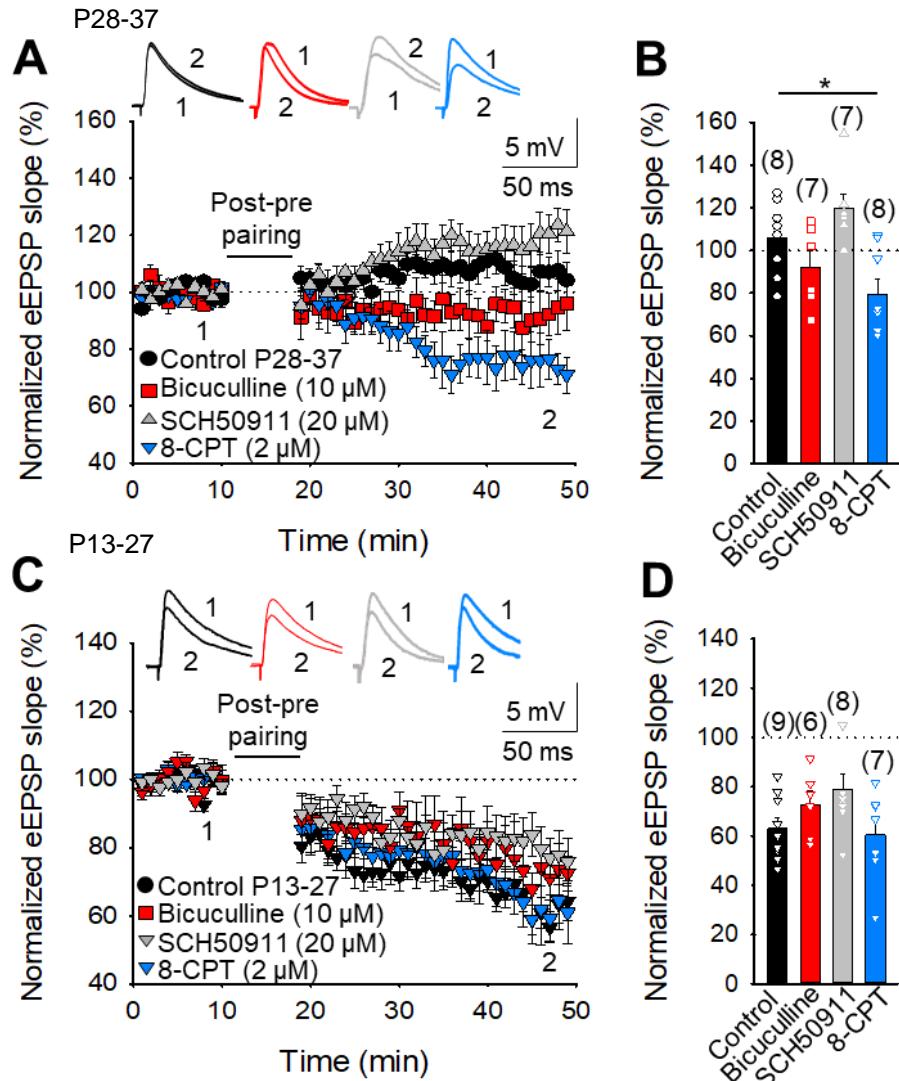


Figura 20. La pérdida de t-LTD se debe a la activación de A₁Rs y no a la activación de receptores GABA_A o GABA_B. (A) La t-LTD perdida a P28-37 no fue recuperada en presencia de Bicuculina (10 μ M, cuadrados rojos) o SCH50911 (20 μ M, triángulos grises), mientras que esa misma t-LTD perdida en las condiciones control (círculos negros) se recuperó completamente en presencia del antagonista de A₁Rs 8-CPT (2 μ M, triángulos azules). Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 minutos después (2) de la inducción del protocolo *post-pre*. (C) A la edad de P13-27, la t-LTD no requiere activación ni de los receptores A₁, ni de los receptores GABA_A o GABA_B, ya que la adición de 8-CPT (2 μ M, triángulos azules), Bicuculina (10 μ M, triángulos rojos) o SCH50911 (20 μ M, triángulos grises) a la solución externa no previno la inducción de la t-LTD (triángulos negros). (B, D) Resumen de los resultados. Los histogramas muestran la media y el error estándar. El número de rodajas se indica entre paréntesis. Test de Kruskal-Wallis (B): *p < 0.05.

Seguidamente, se añadió 8-CPT ($2 \mu\text{M}$) en el baño, sin la aplicación de ningún protocolo de STDP, para determinar su efecto sobre el evocado a distintas edades y determinar si los receptores A₁ están tónicamente activos. La adición de 8-CPT provocó un ligero aumento del evocado en rodajas de animales de edades P13-27 ($114 \pm 5 \%$, $n = 6$) que no resultó estadísticamente significativo, sin embargo, se observó un claro aumento de la pendiente de los eEPSP provocado por dicho antagonista a la edad de P28-37 ($153 \pm 8 \%$, $n = 6$; Figura 21A). Para confirmar si los efectos observados estaban mediados por la activación de A₁R_s presinápticos, se analizó la ratio por pares de pulsos (PPR) en las rodajas tratadas con 8-CPT ($2 \mu\text{M}$) en el baño. Se observó una disminución de la PPR en ambas edades, sugiriendo un efecto presináptico: P13-27 (1.89 ± 0.16 al inicio del experimento frente a 1.4 ± 0.14 en presencia de 8-CPT, $n = 6$) y P28-37 (2.01 ± 0.21 basal frente a 1.44 ± 0.12 con 8-CPT, $n = 6$; Figura 21B).

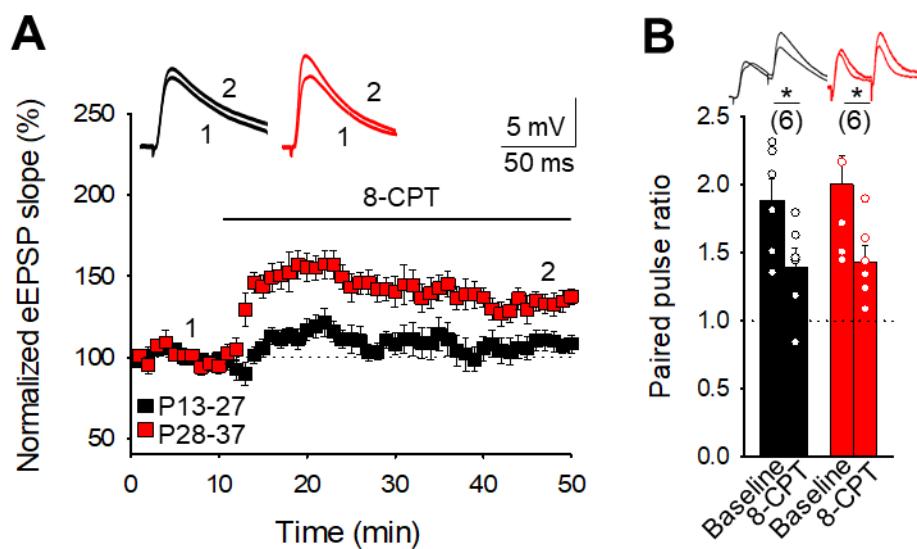


Figura 21. La pérdida de la t-LTD durante el desarrollo implica un aumento en la inhibición mediada por la activación de A₁R_s. (A) El antagonista 8-CPT ($2 \mu\text{M}$) no afectó a la pendiente de los eEPSP a P13-27 (cuadrados negros) pero sí a P28-37 (cuadrados rojos) donde se produce un claro aumento. (B) 8-CPT produce una disminución de la PPR tanto a P13-27 (histogramas negros) como a P28-37 (histogramas rojos). Las barras indican la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Test de Wilcoxon: * $p < 0.05$.

3. La activación de A₁Rs a P13-27 cierra la ventana de plasticidad.

Si el aumento en la concentración de adenosina extracelular a medida que avanza el neurodesarrollo activa los A₁Rs presinápticos en las sinapsis de L4-L2/3, provocando la pérdida de la t-LTD a P28-37, debería ser posible cerrar antes de esta edad la ventana de plasticidad aumentando la activación de los A₁Rs (a P13-27 cuando la t-LTD es robusta). De hecho, cuando los experimentos se realizaron en rodajas tratadas con CPA (30 nM) -agonista de A₁Rs- la t-LTD fue prevenida ($96 \pm 5\%$, $n = 11$ con CPA frente a $59 \pm 6\%$, $n = 7$ en rodajas sin tratar; Figura 22A, B). Es decir, la inhibición provocada por la activación de los A₁Rs presinápticos durante el desarrollo parece ser crucial para la duración de la ventana de plasticidad.

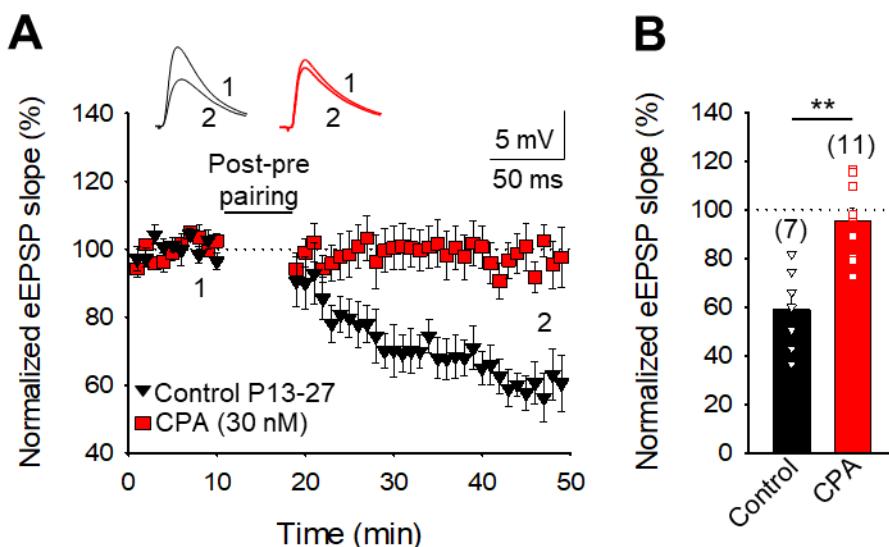


Figura 22. Un aumento en la inhibición mediada por A₁Rs cierra la ventana de plasticidad para la t-LTD a la edad de P13-27. (A) El tratamiento de las rodajas con CPA previene la t-LTD. Se muestran las pendientes de los eEPSP monitorizadas en rodajas controles (triángulos negros) y en rodajas tratadas con el agonista de A₁Rs CPA (30 nM, cuadrados rojos). Trazos durante la línea basal (1) y 30 min después del protocolo de plasticidad (2). (B) Resumen de los resultados. Las barras indican la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Prueba U de Mann-Whitney: **p < 0.01.

4. La pérdida de la t-LTD durante el desarrollo requiere de la señalización de astrocitos para producir un aumento en los niveles de adenosina.

Sabiendo que la adenosina participa en la activación de los A₁Rs presinápticos y la pérdida de la t-LTD durante el desarrollo en la corteza somatosensorial, resulta de especial interés conocer cuál es la fuente de este nucleósido. Los transportadores de nucleósidos pueden estimular la liberación de adenosina en las neuronas y una parte importante de la adenosina liberada en el sistema nervioso surge del metabolismo extracelular del ATP liberado por los astrocitos (Dunwiddie y Masino, 2001; Wall y Dale, 2013). La activación de astrocitos puede provocar la liberación de glutamato (Min y Nevian, 2012) y otros gliotransmisores, como la D-Serina (Andrade-Talavera et al., 2016), así como la de ATP o adenosina (Araque et al., 2014). Por todo esto, se decidió investigar la posible implicación de los astrocitos en la liberación de adenosina que activa los A₁R presinápticos y en la pérdida posterior de la t-LTD durante el desarrollo en la L4-L2/3 de la corteza somatosensorial.

Si el ATP o la adenosina liberados por los astrocitos, posiblemente como resultado de la activación de éstos, está involucrado en la pérdida de la t-LTD durante el desarrollo y, además, este ATP/adenosina se libera en vesículas, impedir la liberación de vesículas por parte de los astrocitos debería prevenir los efectos de la adenosina y favorecer el mantenimiento de la t-LTD. Así, cuando los experimentos de inducción de t-LTD se repitieron a P28-37 en condiciones en las que los astrocitos se trataron con el quelante de calcio (Ca^{2+}) BAPTA (20 mM), se observó una recuperación de la t-LTD ausente en los controles a esa misma edad ($106 \pm 5\%$, $n = 8$, en condiciones control frente a $74 \pm 6\%$, $n = 8$, en rodajas con astrocitos tratados con BAPTA; Figura 23B, C).

Sin embargo, esta recuperación de la t-LTD no ocurrió en condiciones de astrocitos tratados con BAPTA (aBAPTA) y adición de CPA (30 nM) a la solución extracelular ($100 \pm 5\%$, $n = 8$; Figura 23B, C). Estos resultados indican que los astrocitos y la adenosina son responsables de la pérdida de t-LTD a P28-37.

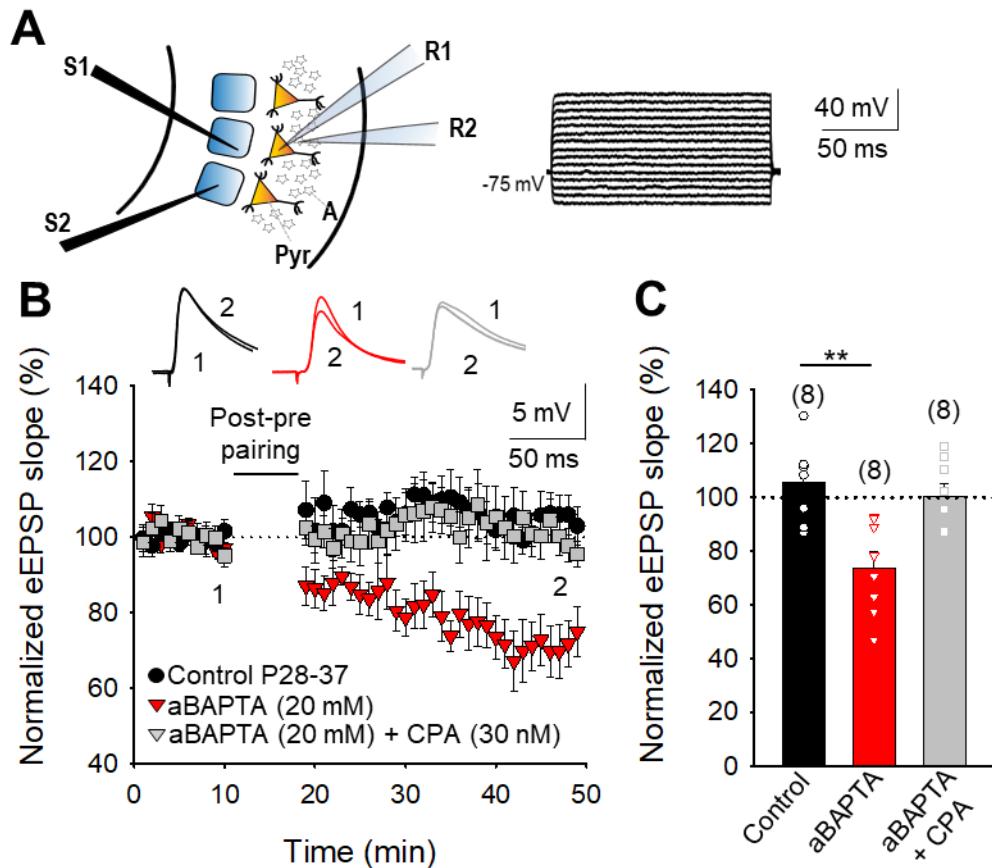


Figura 23. La adenosina involucrada en la prevención de la t-LTD a P28-37 proviene de los astrocitos. (A) Izquierdo, esquema general que muestra la configuración experimental, donde: R_1 (célula piramidal, Pyr) y R_2 (astrocit, A) corresponde a los electrodos de registro y S_1 (ruta pareada) y S_2 (ruta control o no pareada) a los de estimulación. Derecha, respuestas de voltaje de un astrocito con un potencial de -75 mV mostradas en la configuración de *current-clamp*. (B) Registros duales de células piramidales de L2/3 y astrocitos con BAPTA (20 mM) en la pipeta de registro (aBAPTA). Un protocolo *post-pre* induce t-LTD bajo estas condiciones experimentales (triángulos rojos) pero no en condiciones control (sin aBAPTA, círculos negros). La presencia de CPA (30 nM) impidió la recuperación de la t-LTD observada con aBAPTA (cuadrados grises). Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 minutos después la inducción del protocolo de plasticidad (2). (C) Resumen de los resultados. Las barras indican la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis: Test de Kruskal-Wallis: ** $p < 0.01$.

Para obtener más información sobre la función de los astrocitos en la posible liberación de ATP/adenosina que, a su vez, afecta a la liberación de glutamato presináptico, se realizaron registros duales en astrocitos y en neuronas piramidales adyacentes, monitorizando el curso temporal de la pendiente de los EPSP evocados a 0.2 Hz a P13-27 y a P28-37. A P13-27, la estimulación directa de astrocitos (despolarización de -80 mV a 0 mV a 0.4 Hz durante 10 min) produjo una clara disminución en la pendiente de los eEPSP ($71 \pm 6\%$, n = 7), que no fue evidente en presencia de 8-CPT (2 μ M: $99 \pm 7\%$, n = 7; Figura 24A, B). También se observó una disminución en la pendiente de los eEPSP a P28-37 cuando se estimularon los astrocitos ($78 \pm 4\%$, n = 7) y, de nuevo, la estimulación de los astrocitos no afectó a la pendiente de los EPSPs en presencia de 8-CPT ($98 \pm 4\%$, n = 7; Figura 24D, E).

Asimismo, se encontró un claro aumento en las PPR después de la estimulación de astrocitos a P13-27 (de 1.20 ± 0.14 al inicio del experimento a 1.70 ± 0.15 al final, n = 6; Figura 24C) y P28-37 (desde 1.50 ± 0.25 al inicio hasta 1.90 ± 0.35 , n = 6 al final; Figura 24F), lo que sugiere un mecanismo presináptico para esta disminución de la pendiente de los eEPSP. Estos resultados indican que la liberación de ATP/adenosina después de la estimulación de los astrocitos altera la probabilidad de liberación de glutamato a través de la activación de A₁Rs presinápticos, que influyen en la pérdida de la t-LTD durante el desarrollo y cierran la ventana de plasticidad en las sinapsis de L4-L2/3.

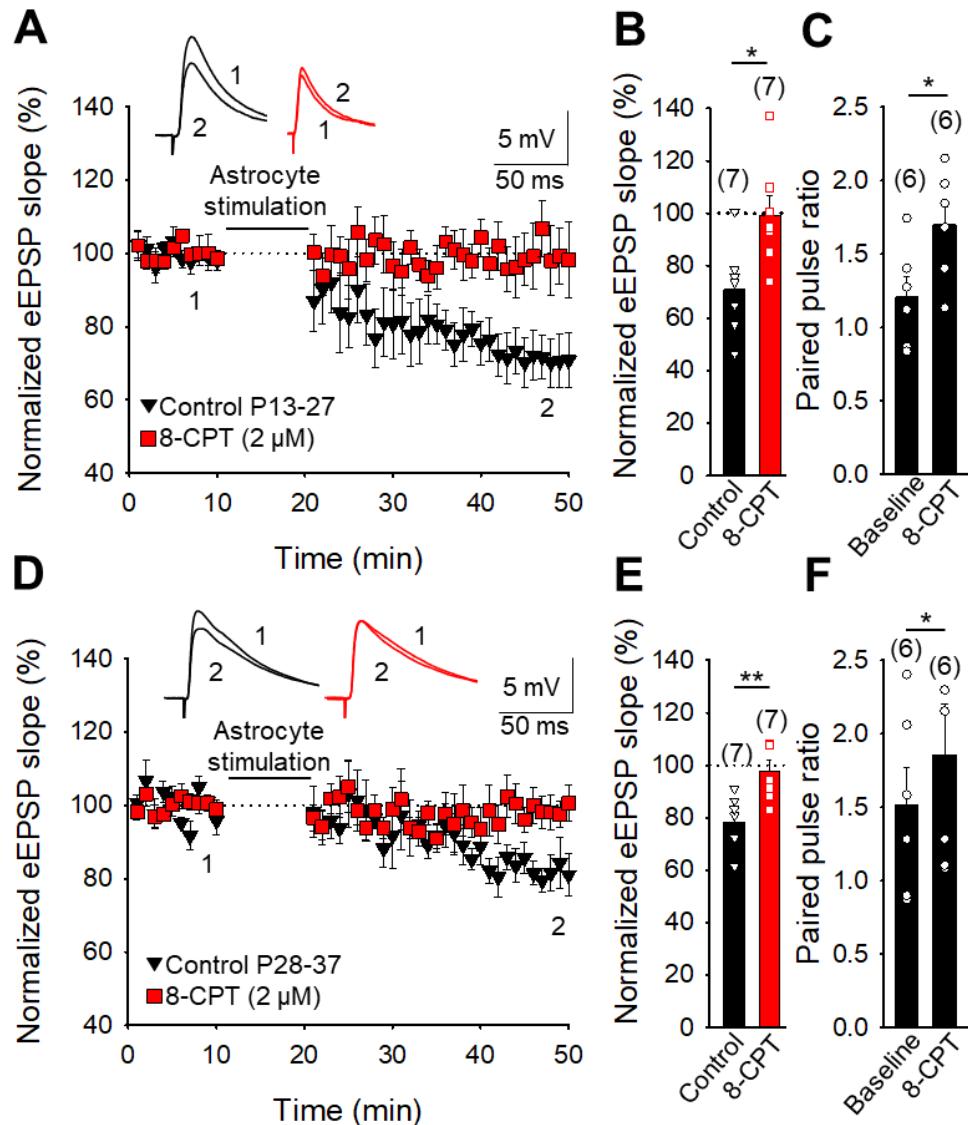


Figura 24. Los astrocitos se requieren para la pérdida de la t-LTD durante el neurodesarrollo. (A-F)

La estimulación directa de los astrocitos (mediante una despolarización de -80 mV a 0 mV a 0.4 Hz durante 10 min) disminuye la pendiente de los eEPSP de las neuronas piramidales adyacentes en la sinapsis de L4-L2/3 tanto a P13-27 como a P28-37 (A-B y D-E respectivamente, triángulos negros en ambos casos). En rodajas tratadas con 8-CPT (2 μM) la estimulación de los astrocitos no afectó a la pendiente de los eEPSP a ninguna de las edades estudiadas (cuadrados rojos). (C, F) Se observó un aumento en la PPR después de la estimulación de los astrocitos. Los histogramas indican las medias y el error estándar. El número de rodajas utilizadas se muestra entre paréntesis. Test de U de Mann-Whitney (B, E) y prueba de rangos de Wilcoxon (C, F); *p < 0.05, **p < 0.01.

5. El protocolo que induce t-LTD a P13-37 induce t-LTP a P38-60.

Recientemente, se ha descrito la existencia de un cambio de t-LTD a t-LTP durante el desarrollo en el hipocampo, en edades donde ya se ha perdido la t-LTD (Falcón-Moya et al., 2020). Se estudió si lo mismo ocurre en la corteza somatosensorial primaria y, en concreto, en la sinapsis de L4-L2/3. Para ello, se estudió esta sinapsis a edades más avanzadas utilizando el mismo protocolo *post-pre* con un potencial de acción postsináptico producido 18 ms antes de la estimulación presináptica ($\Delta t = -18$ ms). Como se ha evidenciado previamente en el presente estudio, con este protocolo se induce una clara t-LTD en animales P13-27 que se pierde a P28-37. En contraste, aplicando el mismo protocolo a edades comprendidas entre P38-60 se observó una potenciación como resultado ($139 \pm 4\%$, $n = 6$ en la ruta pareada frente a $102 \pm 5\%$, $n = 6$ en la ruta no pareada; Figura 25A, B).

Para determinar si el cambio observado también puede ocurrir a otro intervalo de tiempo entre el potencial de acción postsináptico y la estimulación presináptica, se repitieron los experimentos usando un intervalo de tiempo de -10 ms. En estas condiciones, se observó un cambio a t-LTP ($136 \pm 6\%$, $n = 6$) idéntico al que se veía con -18 ms ($134 \pm 6\%$, $n = 6$; Figura 25C, D).

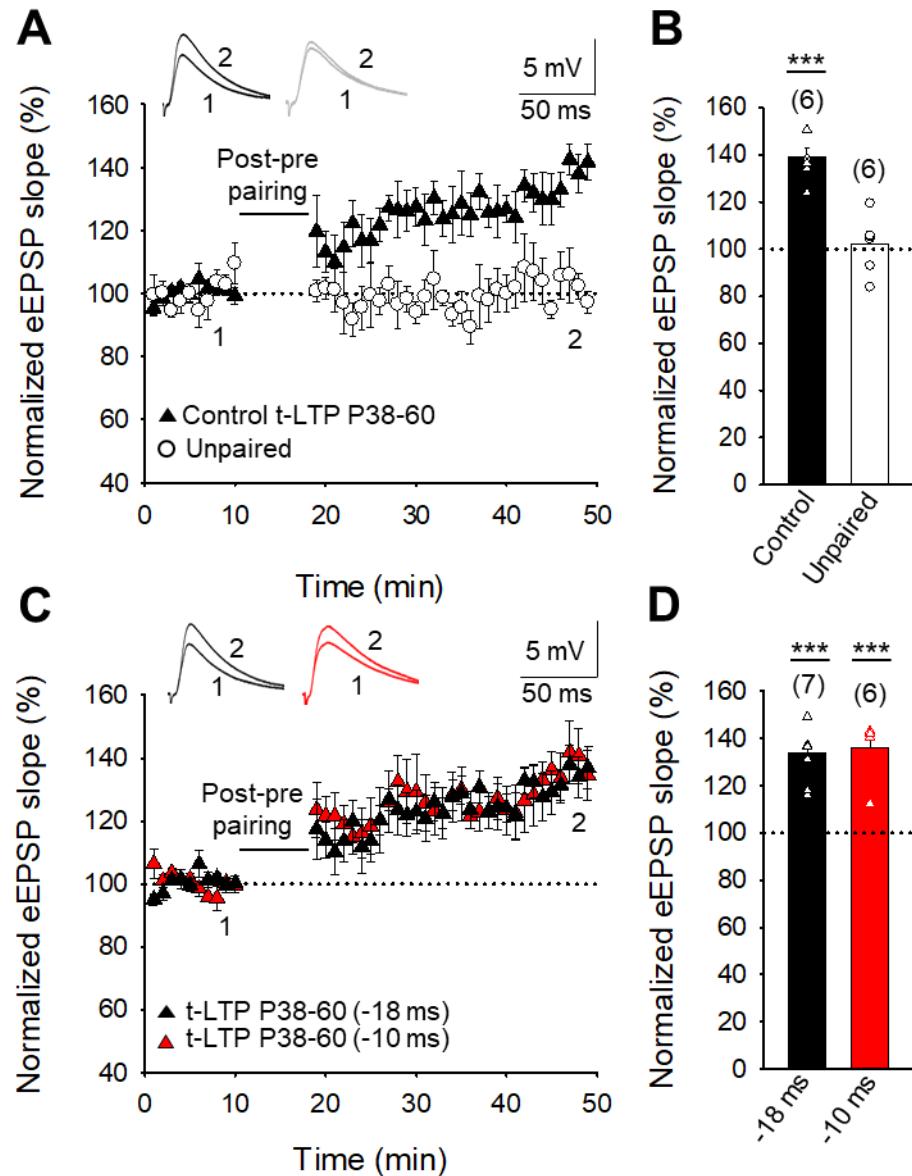


Figura 25. El protocolo post-pre induce t-LTP a la edad de P38-60. (A) Se muestran las pendientes de los eEPSP en la ruta pareada (triángulos negros) y la no pareada (círculos blancos). Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 minutos después (2) de la inducción del protocolo de plasticidad en la ruta pareada y sólo en esta ruta se observó t-LTP. (B) Resumen de los resultados. (C) El protocolo *post-pre* que induce t-LTP con un $\Delta t = -18$ ms (triángulos negros), también es capaz de inducir t-LTP cuando el $\Delta t = -10$ ms (triángulos rojos). (D) Resumen de los resultados. Las barras indican la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Test de U de Mann-Whitney (B, D): ***p < 0.001.

6. Expresión presináptica de la t-LTP.

Se sabe que la t-LTD se expresa de forma presináptica en las sinapsis de L4-L2/3 de la corteza somatosensorial (Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006; Brasier y Feldman, 2008; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2011). Se determinó si con este protocolo *post-pre* a edades P38-60 la t-LTP resultante se expresa de forma pre o postsináptica. Para ello, se realizó el análisis de la ratio por pares de pulsos (PPR) y el coeficiente de variación (CV). En primer lugar, se analizó la PPR al inicio y 30 minutos después de finalizar el protocolo *post-pre*, obteniéndose una disminución significativa en el PPR después de la t-LTP (desde 1.55 ± 0.15 basal hasta 1.16 ± 0.11 , $n = 9$ al final del experimento; Figura 26A), lo cual sugiere un cambio presináptico. En segundo lugar, se estimó el CV antes y después de la inducción de la t-LTP. Una gráfica de CV^{-2} frente al cambio en la pendiente media evocada de los EPSPs antes y después de la t-LTP situó puntos por encima de la línea diagonal principalmente, consistentes con una modificación presináptica (Figura 26). Cuando los datos se acercan a la línea horizontal se trata de un mecanismo expresado postsinápticamente, mientras que si los datos están por encima de la diagonal para la LTP o por debajo para la LTD sugieren un locus de acción presináptico (Brock et al., 2020). Por tanto, ambas aproximaciones sugieren un aumento en la probabilidad de liberación de neurotransmisor y son indicativos de un mecanismo presináptico para esta forma de t-LTP.

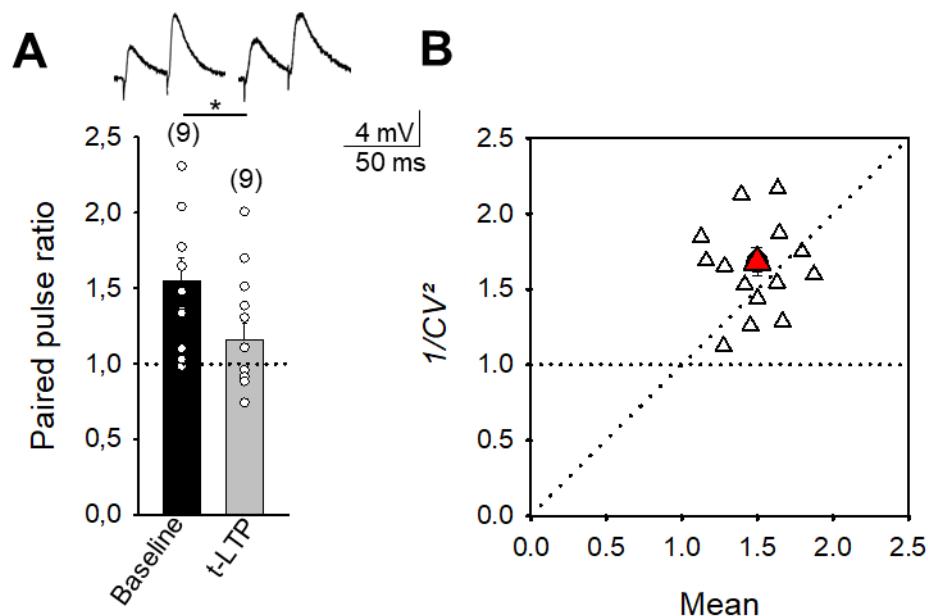


Figura 26. La t-LTP inducida por un protocolo *post-pre* a P38-60 se expresa presinápticamente. (A) La PPR disminuye después de la t-LTP y se muestra un ejemplo de trazos al inicio de la línea basal y 30 minutos después de la inducción de la t-LTP. **(B)** CV^2 frente a la pendiente media de los eEPSP produce unos puntos de datos que están principalmente por encima de la diagonal después de inducir t-LTP. Las barras indican la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Prueba de rangos de Wilcoxon (A): *p < 0.05.

7. La t-LTP presináptica requiere receptores de NMDA (NMDARs).

La t-LTP que aparece a edades P38-60 resultó impedita en presencia antagonistas de NMDARs como D-AP5 (50 μ M: $106 \pm 10\%$, n = 7) y MK-801 (500 μ M; $87 \pm 7\%$, n = 6) al comparar con los controles a la misma edad ($141 \pm 5\%$, n = 9; Figura 27A, B). Por lo tanto, la t-LTP de naturaleza presináptica, inducida por un protocolo *post-pre*, que está presente en ratones P38-60 requiere de este tipo de receptores para su inducción (Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006; Banerjee et al., 2009; Brasier y Feldman, 2008; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2011).

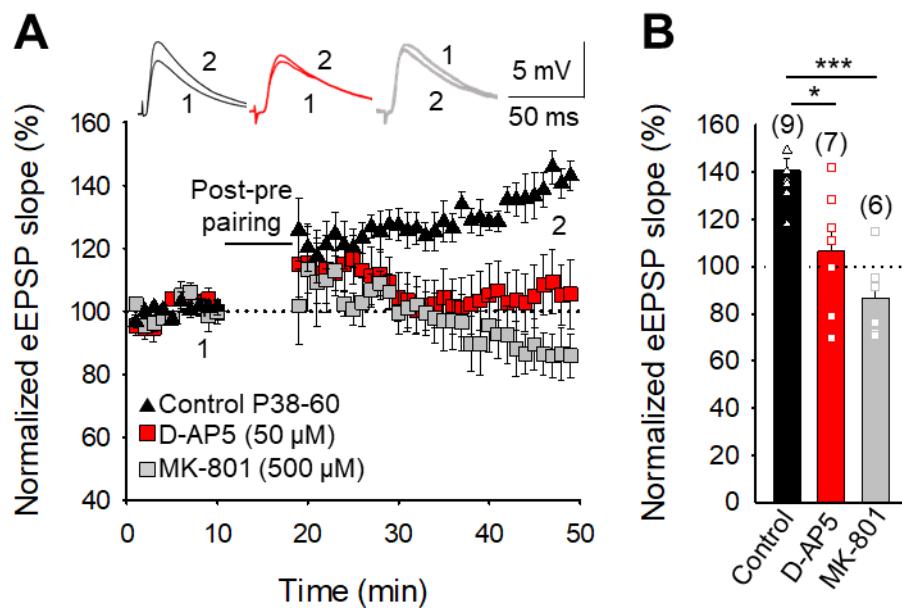


Figura 27. La t-LTP presináptica requiere de NMDARs. (A) Añadir D-AP5 (50 μ M) o MK-801 (500 μ M) a la solución extracelular de la perfusión previno la inducción de la t-LTP. Se muestran los cursos temporales de los registros con D-AP5 (cuadrados rojos), MK-801 (cuadrados grises) y células no tratadas (triángulos negros) y los trazos correspondientes antes (1) y después (2) del protocolo *post-pre*. (B) Resumen de resultados. Las barras representan la media y el error estándar. El número de rodajas utilizadas se muestra entre paréntesis. Test de Kruskal-Wallis: *p < 0.05, ***p < 0.001.

8. La t-LTP presináptica requiere de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs).

Los mGluRs han sido implicados en plasticidad y LTP en diferentes regiones y en distintas sinapsis (Anwyl, 2009). Se estudió si la t-LTP presináptica que está presente en la sinapsis L4-L2/3 a P38-60 también requiere de mGluRs. Se observó que la t-LTP resultó prevenida tras la exposición al antagonista de mGluRs de amplio espectro LY341495 (100 μ M: $94 \pm 10\%$; n = 6; Figura 28A, C) y también cuando las rodajas fueron tratadas con el antagonista de mGluRs específico para el grupo I (mGluRs1) LY367385 (100 μ M; $113 \pm 8\%$, n = 7), frente a los resultados obtenidos tras inducir el protocolo *post-pre* en rodajas sin tratar ($146 \pm 5\%$, n = 7; Figura 28A, C). Estos datos indican que los mGluR1s son necesarios para inducir la t-LTP estudiada.

A continuación, se repitieron los mismos experimentos introduciendo en la pipeta GDP β S (1 mM) para evitar la señalización mediada por proteínas G y así determinar si los mGluRs podían estar situados en la célula postsináptica. En esta situación experimental, la inducción de la t-LTP fue impeditida ($101 \pm 10\%$, n = 8) en comparación con la situación control ($137 \pm 4\%$, n = 7) (Figura 28B, C). Por lo tanto, los mGluR1s, necesarios para la inducción de la t-LTP, podrían estar ubicados en el terminal postsináptico.

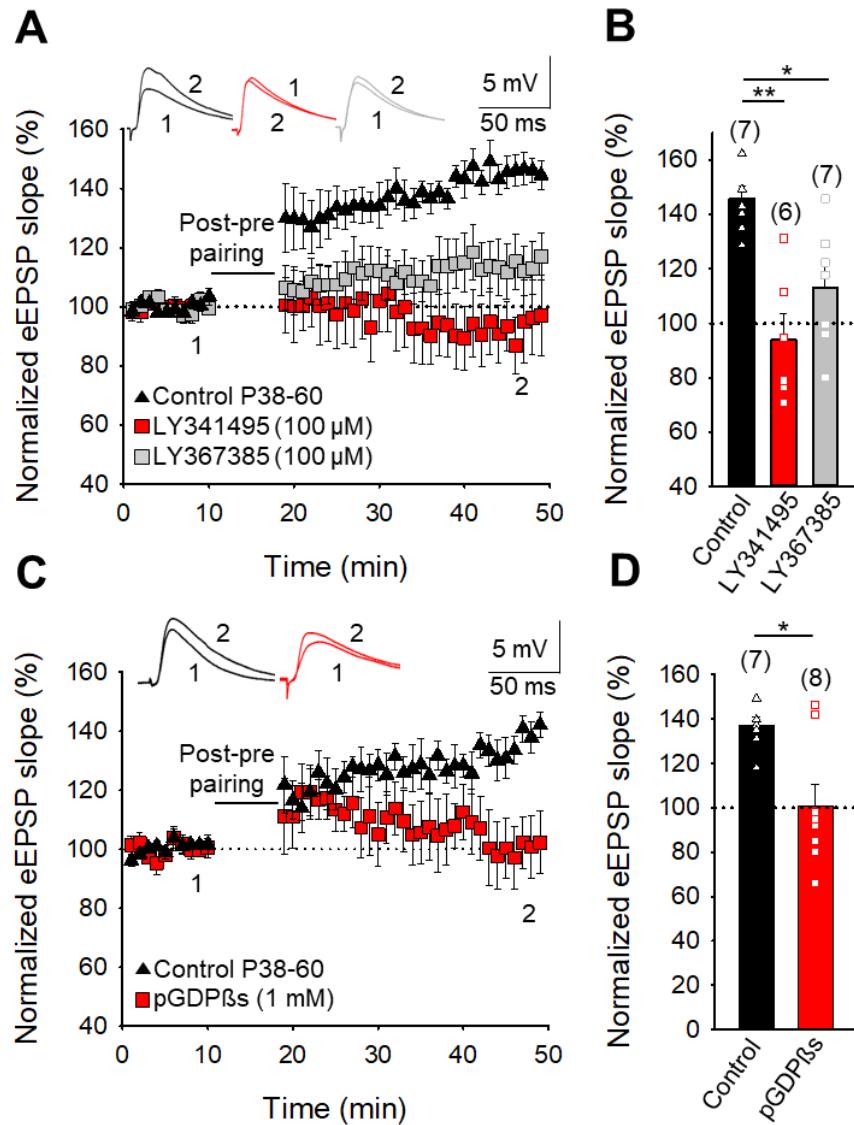


Figura 28. La t-LTP presináptica requiere de receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGluR1s). (A) Se muestran las pendientes de los EPSP monitorizadas al aplicar el protocolo *post-pre* en rodajas control (triángulos negros), tratadas con el antagonista LY341495 (100 μ M, cuadrados rojos) o con el antagonista LY367385 (100 μ M, cuadrados grises), así como los trazos correspondientes antes (1) y 30 min después (2) de la aplicación del protocolo de plasticidad. (C) Los mGluRs podrían ser postsinápticos. Se muestra el curso temporal de la inducción de la t-LTP en condiciones control (triángulos negros) y su bloqueo con GDP β s (1 mM) en la neurona postsináptica (cuadrados rojos). (B, D) Resumen de resultados. Las barras indican la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Test de Kruskal-Wallis (B): *p < 0.05, **p < 0.01; y U de Mann-Whitney (D): *p < 0.05.

9. La t-LTP requiere de Ca²⁺ postsináptico.

Estudios previos muestran que tanto la t-LTD como la t-LTP requieren de Ca²⁺ postsináptico en experimentos realizados en las sinapsis de la neocorteza (Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006; Rodríguez-Moreno et al., 2013) y en las del hipocampo (Andrade-Talavera et al., 2016; Falcón-Moya et al., 2020; Mateos-Aparicio y Rodríguez-Moreno, 2020). Para determinar si algo similar ocurre en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial, se introdujo en la pipeta de registro el quelante de calcio BAPTA (20 mM). En estas condiciones, no fue posible inducir la t-LTP ($101 \pm 6\%$, n = 6; Figura 29A, B), lo que demostró que es necesario el calcio postsináptico para esta forma de t-LTP.

Seguidamente, se determinó si los canales de Ca²⁺ tipo L, que han sido implicados en formas de plasticidad en la corteza (Bender et al., 2006; Nevian y Sakmann, 2006), participan en esta forma de t-LTP. Para ello, se aplicó el bloqueador de canales de Ca²⁺ tipo L -nimodipina (10 μM). De nuevo, la t-LTP se impidió bajo estas condiciones experimentales ($103 \pm 10\%$, n = 7; Figura 29A, B). Por último, se estudió si el Ca²⁺ proveniente de las reservas intracelulares participa en la inducción de t-LTP introduciendo en la neurona postsináptica thapsigargina (10 μM) y se previno la inducción de la t-LTP (104 ± 11 , n = 7; Figura 29A, B). Por lo tanto, se requiere la liberación de Ca²⁺ de las reservas intracelulares para poder inducir t-LTP. Las tres condiciones experimentales diferentes (BAPTA, nimodipina y thapsigargina) fueron comparadas frente a condiciones control de rodajas sin tratar que sí mostraron t-LTP ($144 \pm 6\%$, n = 9; Figura 29A, B).

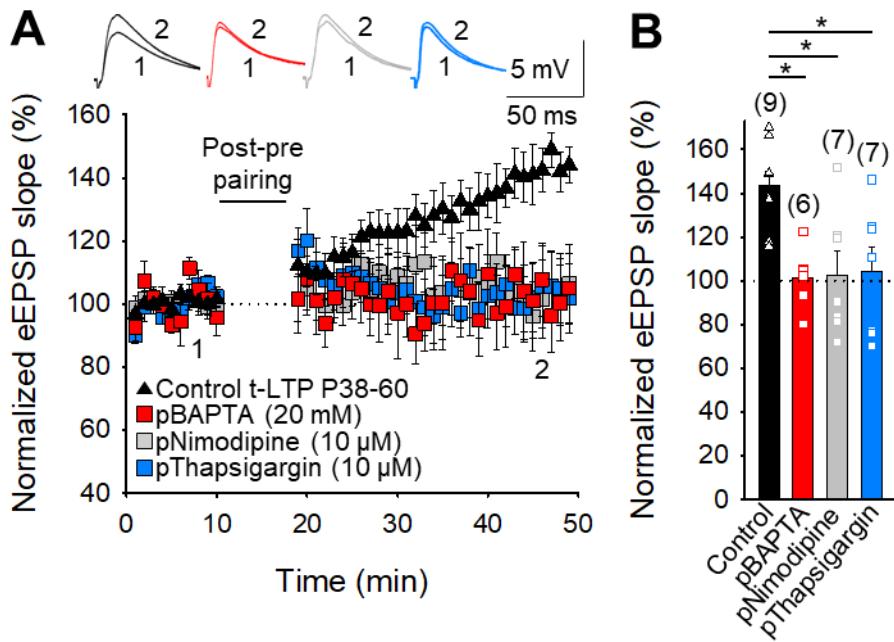


Figura 29. El Ca^{2+} postsináptico es requerido para la inducción de t-LTP. (A) La t-LTP se previene al introducir en la pipeta de registro BAPTA (20 mM), nimodipina (10 μM) y thapsigargin (10 μM). Las pendientes de los eEPSP se muestran en rodajas control (triángulos negros) y en rodajas tratadas con BAPTA (cuadrados rojos), nimodipina (cuadrados grises) o thapsigargin (cuadrados azules). Se muestran los trazos de los eEPSP antes (1) y 30 min después (2) del protocolo de plasticidad. (B) Resumen de resultados. Las barras indican la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Test de Kruskal-Wallis: * $p < 0.05$.

10. La t-LTP presináptica requiere de óxido nítrico (NO).

NO ha sido identificado como señal retrógrada implicada en la LTP presináptica (Castillo, 2012; Pigott y Garthwaite, 2016; Padamsey et al., 2017) y hay evidencia de que la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio tipo L podría participar en la síntesis de NO y/o su liberación desde las neuronas postsinápticas (Parpura y Zorec, 2010; Castillo, 2012). Recientemente, se demostró que el NO de la neurona postsináptica es necesario para inducir la t-LTP presináptica encontrada en el hipocampo (Falcón-Moya et al., 2020). En el presente trabajo, la inducción de la t-LTP ($136 \pm 8\%$, $n = 6$) se previno cuando se introdujo el secuestrador de NO cPTIO ($100 \mu\text{M}$; $93 \pm 12\%$, $n = 6$) o el inhibidor de NO sintasa L-NAME ($100 \mu\text{M}$; $87 \pm 7\%$, $n = 6$) en la neurona postsináptica (Figura 30A, B). Sin embargo, la t-LTD estuvo presente cuando L-NAME fue agregado a la solución externa a edades P13-27 ($67 \pm 8\%$, $n = 6$, frente a $66 \pm 6\%$, $n = 6$ de su respectivo control a la misma edad; Figura 30C, D). Estos resultados indican que el NO producido y liberado por la neurona postsináptica se requiere de forma específica para hacer posible la inducción de la t-LTP.

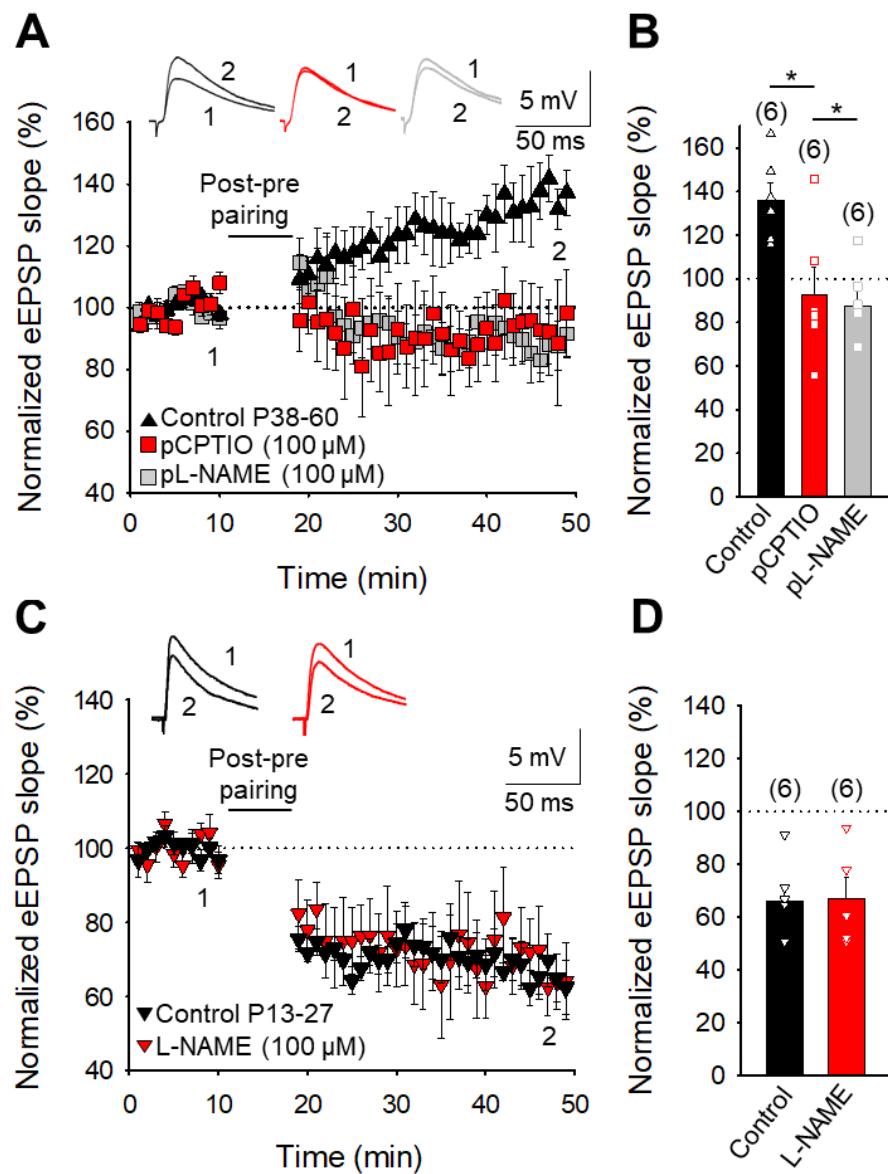


Figura 30. El óxido nítrico (NO) es necesario para la inducción de la t-LTP. (A) Curso temporal del efecto del protocolo *post-pre* en condiciones control (triángulos negros) e introduciendo en la pipeta de registro cPTIO (100 μ M, cuadrados rojos) o L-NAME (100 μ M, cuadrados grises). Se muestran los trazos de los eEPSP antes (1) y después de 30 min (2) del protocolo de plasticidad. (C) El NO es necesario para inducir la t-LTD a P13-27. Se muestran las pendientes de los eEPSP monitorizadas en condiciones control (triángulos negros) y en presencia de L-NAME (100 μ M, triángulos rojos) y los trazos correspondientes antes (1) y 30 min después (2) de la inducción del protocolo para cada condición. (B, D) Resumen de resultados. Los histogramas muestran la media y el error estándar. El número de rodajas aparece entre paréntesis. Test de Kruskal-Wallis: * $p < 0.05$.

11. La t-LTP requiere actividad astrocitaria.

Los astrocitos están implicados en la t-LTD en las sinapsis estudiadas (Min y Nevian, 2012; Rodríguez-Moreno et al., 2013), y se sabe que participan en el cierre de la ventana de plasticidad a medida que madura el hipocampo. Por ello, se analizó si la activación de los astrocitos también es necesaria para inducir la forma presináptica de t-LTP que aparece después de P38 en la sinapsis de L4-L2/3. En rodajas de ratones P38-60, cuando los astrocitos fueron tratados con el quelante de Ca^{2+} BAPTA (20 mM) a través de la pipeta de registro con el objetivo de inhibir la liberación vesicular y de gliotransmisores dependientes de Ca^{2+} (Pascual et al., 2005), la t-LTP no se pudo observar en las neuronas que fueron registradas junto a los astrocitos ($105 \pm 9\%$, $n = 9$; Figura 31A, B).

El estudio se repitió en ratones (dn)-SNARE de edades P38-60 en los que la liberación vesicular de gliotransmisores está impedida (Pascual et al., 2005; Sardinha et al., 2017). En las rodajas de ratones (dn)-SNARE, la actividad espontánea basal de las neuronas de la sinapsis de L4-L2/3 fue ligeramente más elevada ($23 \pm 8\%$, $n = 7$) debido a la falta de inhibición tónica de ATP/adenosina, y también fue necesaria una estimulación menos intensa para obtener la misma amplitud de los eEPSP que en rodajas de ratones WT, como se informó anteriormente en otras regiones (Pascual et al., 2005; Sardinha et al., 2017). En estos ratones transgénicos, la t-LTP observada en wild-type (WT) a la edad P38-60 en la sinapsis L4-L2/3 ($148 \pm 7\%$, $n = 9$) no se observó ($83 \pm 5\%$, $n = 7$; Figura 31A, B). Estos resultados indican que se requieren astrocitos para la inducción de t-LTP a P38-60.

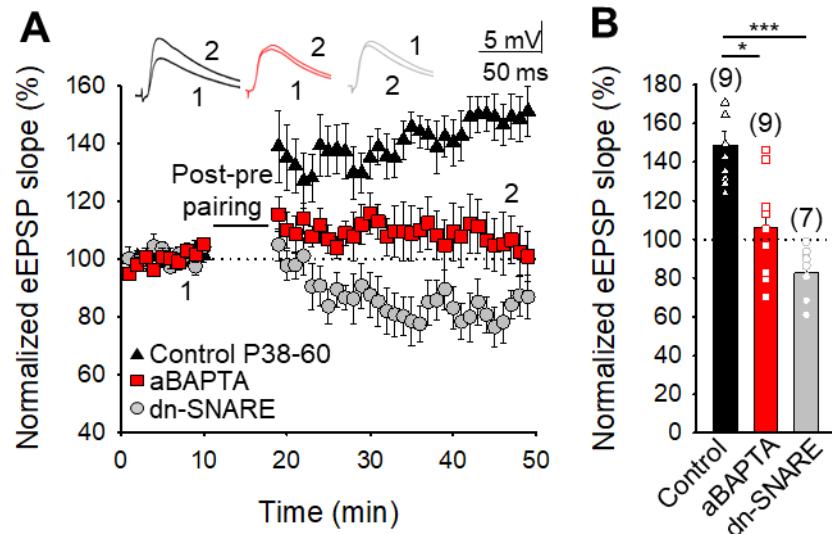


Figura 31. Los astrocitos son requeridos para la inducción de la t-LTP. (A) Curso temporal de la inducción de la t-LTP en condiciones control (triángulos negros) y cuando se pierde tratando los astrocitos con BAPTA (20 mM, cuadrados rojos) o usando ratones dn-SNARE (círculos grises). Se muestran los trazos antes (1) y 30 min después del protocolo de plasticidad (2). (B) Resumen de resultados. Las barras muestran la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Test de Kruskal-Wallis: *p < 0.05, ***p < 0.001.

12. El aumento de la inhibición mediada por la activación de A₁Rs presinápticos está involucrado en la t-LTP.

Se demostró previamente que la activación presináptica de A₁Rs es responsable de la pérdida de la t-LTD en animales P28-37. El antagonista de A₁Rs 8-CPT, 2 μM no afectó a la t-LTD a P13-27 (Figura 20B, C), pero sí recuperó la t-LTD perdida a P28-37 (Figura 20A, B). Cuando se midió la pendiente de los eEPSP en presencia de este antagonista de A₁Rs, se observó un efecto más pronunciado a la edad P28-37 que a la de P13-27 (Figura 20A, B). A continuación, se observó que este antagonista previno la inducción de t-LTP a la edad P38-60 ($68 \pm 6\%$, n = 6, frente a $140 \pm 3\%$, n = 6, en rodajas sin tratar; Figura 20A, B).

Si los niveles de adenosina extracelular continúan aumentando a medida que avanza el neurodesarrollo, se esperaría una mayor activación de los A₁Rs presinápticos a edades P38-60. De hecho, la pendiente de los eEPSP aumentó más en presencia de 8-CPT (2 μM) a esta edad más tardía (P38-60: $218 \pm 10\%$, n = 7) que a edades tempranas P13-27 ($117 \pm 4\%$, n = 7) o intermedias P28-37 ($150 \pm 8\%$, n = 6; Figura 32C, D). Estos resultados indican que la inhibición mediada por la activación de A₁Rs presinápticos aumenta con el neurodesarrollo.

También se estudió el efecto del antagonista 8-CPT en ratones (dn)-SNARE para determinar si la adenosina que activa a los A₁Rs se origina en los astrocitos y se encontró que el 8-CPT prácticamente no tuvo efecto sobre la pendiente de los eEPSP en estos ratones a cualquiera de las edades estudiadas (P13-27: $115 \pm 6\%$, n = 8; P28-37: $112 \pm 9\%$, n = 8; y P38-60: $115 \pm 12\%$, n = 6. Figura 32C, D).

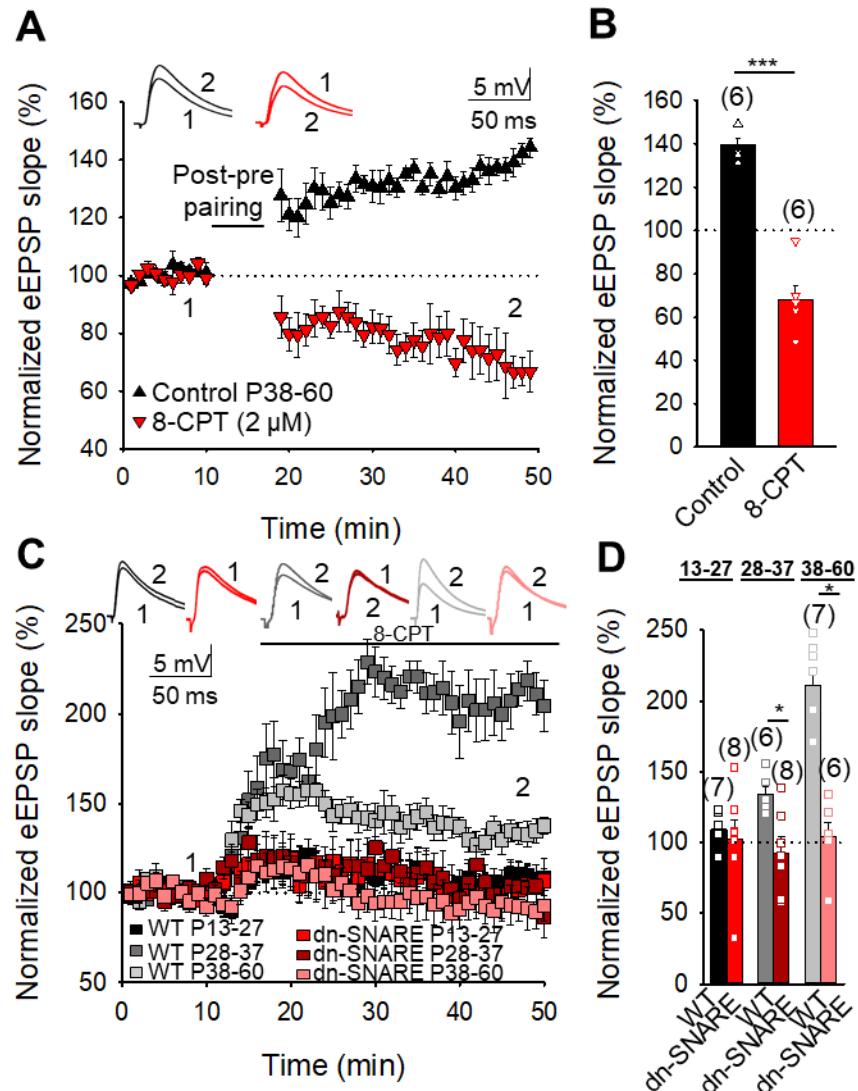


Figura 32. Participación de los A₁R por acción de adenosina procedente de los astrocitos en la t-LTP. (A) Curso temporal de los eEPSP antes y después de la inducción de la t-LTP en condiciones control (triángulos negros) y tras su pérdida en rodajas tratadas con 8-CPT (2 μ M, triángulos rojos). Los trazos representan los eEPSP antes (1) y 30 min después del protocolo post-pre (2). (B) Resumen de los resultados. (C) 8-CPT aumentó la pendiente de los eEPSP a P13-27 (cuadrados negros), P28-37 (cuadrados grises oscuros) y P38-60 (cuadrados grises claros) en ratones WT, pero no en ratones dn-SNARE (P13-27, cuadrados rojos; P28-37, cuadrados rojos oscuros; P38-60, cuadrados rojos claros). (D) Resumen de los resultados. Las barras muestran la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Test U de Mann-Whitney: *p < 0.05; ***p < 0.001.

13. La activación de los A₁Rs a la edad de P13-27 convierte la t-LTD en t-LTP.

Si las concentraciones extracelulares de adenosina aumentan durante el desarrollo y produce mayor activación de A₁Rs presinápticos en L4-L2/3 amortiguando la liberación de glutamato y mediando un cambio de t-LTD a t-LTP en rodajas de animales P38-60, podría ser posible convertir la t-LTD en t-LTP a edades más jóvenes al activar los A₁Rs (por ejemplo, a P13-27 cuando la t-LTD es robusta o a P28-37 cuando esta t-LTD se pierde).

En experimentos anteriores de este estudio, se demostró que el agonista de A₁Rs CPA (30 nM) no puede convertir la t-LTD en t-LTP, pero sí evita o previene la inducción de la t-LTD a P13-27 (Figura 21A, B). Sin embargo, el aumento de la concentración de CPA a 60 nM sí logró convertir la t-LTD en t-LTP a la edad de P13-27 (de $65 \pm 4\%$, $n = 8$, a $125 \pm 7\%$, $n = 10$; Figura 33A, B). Estos resultados fueron consistentes con una participación necesaria de los A₁Rs en el cambio que se produce de t-LTD a t-LTP asociado con el desarrollo del cerebro, y sugieren que la adenosina que activa los A₁Rs puede ser liberada por los astrocitos.

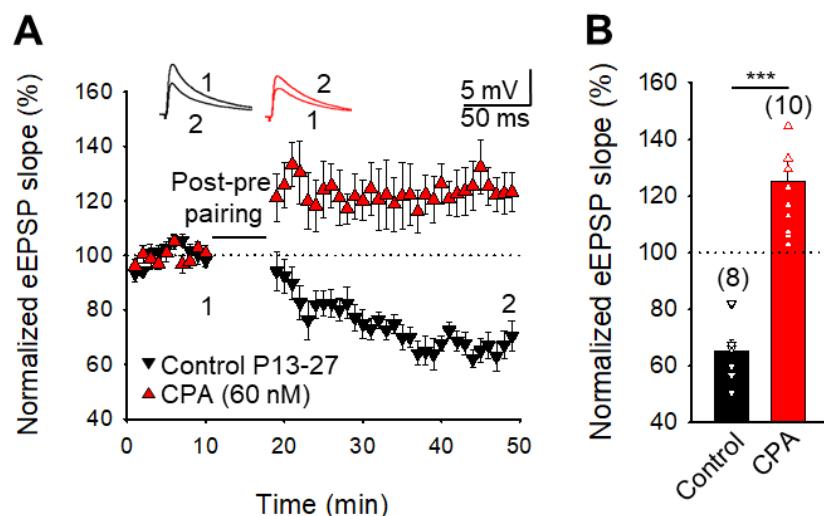


Figura 33. Un aumento en la inhibición mediada por A₁Rs presinápticos convierte la t-LTD en t-LTP a P13-27. (A) Cuando los A₁Rs son activados por CPA (60 nM) a P13-27, un protocolo *post-pre* pudo inducir t-LTP. Se muestran las pendientes de los EPSPs monitorizadas en condiciones control (triángulos negros) y en presencia de CPA aplicado al baño (triángulos rojos). Los trazos son ejemplos de los eEPSP antes (1) y 30 min después (2) del protocolo de plasticidad. (B) Resumen de resultados. Los histogramas muestran la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Test de U de Mann-Whitney: ***p < 0.001.

14. Se requiere tanto adenosina como glutamato para inducir t-LTP.

Podría esperarse que si ATP/adenosina fuera el único gliotransmisor involucrado en el cambio de t-LTD a t-LTP, el agonista de los A₁Rs CPA debería poder recuperar la t-LTP a edades P38-60 en ratones (dn)-SNARE cuando de otro modo no se observaría t-LTP. Sin embargo, la t-LTP no fue recuperada tras el tratamiento con CPA ($105 \pm 8\%$, $n = 6$, frente a $149 \pm 7\%$, $n = 9$, en rodajas control; Figura 34A, B), lo que sugiere que otro gliotransmisor liberado por los astrocitos, o justo después de la activación de los astrocitos, también podría estar implicado. Por este motivo, se determinó si también se puede requerir glutamato para inducir la t-LTP presináptica en animales P38-60 mediante aplicaciones locales de glutamato. Cuando se aplicaron “puffs” de glutamato en rodajas de ratones (dn)-SNARE en presencia de CPA, se recuperó parcialmente la t-LTP ($122 \pm 6\%$, $n = 6$; Figura 34A, B), lo que indica que ATP/adenosina y glutamato, probablemente liberados como gliotransmisores por los astrocitos, son necesarios para la inducción de la t-LTP.

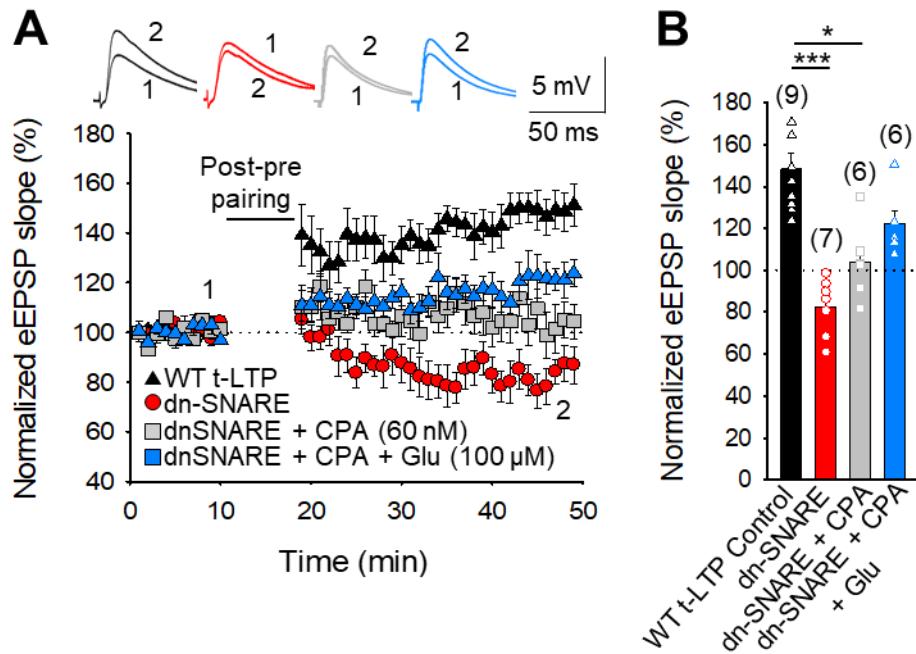


Figura 34. La liberación de glutamato y adenosina por los astrocitos es necesaria para la inducción de la t-LTP presináptica. (A) Curso temporal del efecto del protocolo *post-pre* en condiciones control en rodajas de animales WT (triángulos negros), en rodajas de ratones dn-SNARE (círculos rojos), en rodajas de ratones dn-SNARE tratadas con CPA (60 nM, cuadrados grises) y en rodajas de animales dn-SNARE tratadas con CPA y a las que se le aplicaron *puffs* de glutamato (100 µM, triángulos azules). Se muestran los trazos de los eEPSP antes (1) y 30 min después del protocolo de plasticidad (2). (B) Resumen de resultados. Las barras muestran la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Test de Kruskal Wallis: *p < 0.05, ***p < 0.001.

Finalmente, para definir la señal que podría estimular a los astrocitos a liberar gliotransmisores y mediar esta forma de LTP, se estudió el papel del NO, cuya liberación desde la neurona postsináptica es necesaria para la t-LTP. Se demostró previamente que el NO aumenta el calcio que ingresa y estimula los astrocitos (Matyash et al., 2001), planteando la posibilidad de que el NO pudiera activar o interactuar con los astrocitos para liberar ATP/adenosina y/o glutamato en estas condiciones. Es relevante señalar que la inducción de t-LTP se evitó tratando los astrocitos con cPTIO (acPTIO: $96 \pm 10\%$, n = 6) pero no cuando se trataron con L-NAME (aL-NAME: $135 \pm 9\%$, n = 6, frente a rodajas control no tratadas con ningún agente farmacológico $137 \pm 4\%$, n = 7, Figura 35A, B).

Además, cuando se previno la inducción de t-LTP con aL-NAME, las aplicaciones locales del donador de NO DETA-NONOate (5 mM) en los astrocitos recuperaron la t-LTP ($122 \pm 6\%$, $n = 6$; Figura 35A, B), aunque DETA-NONOate no afectó a la t-LTD a P13-27 (DETA-NONOate $64 \pm 6\%$, $n = 6$, frente a rodajas sin tratar $70 \pm 5\%$, $n = 6$; Figura 35C, D). Por tanto, el NO que participó en esta forma de t-LTP no fue sintetizado por los astrocitos, sino que tuvo su origen en la neurona postsináptica.

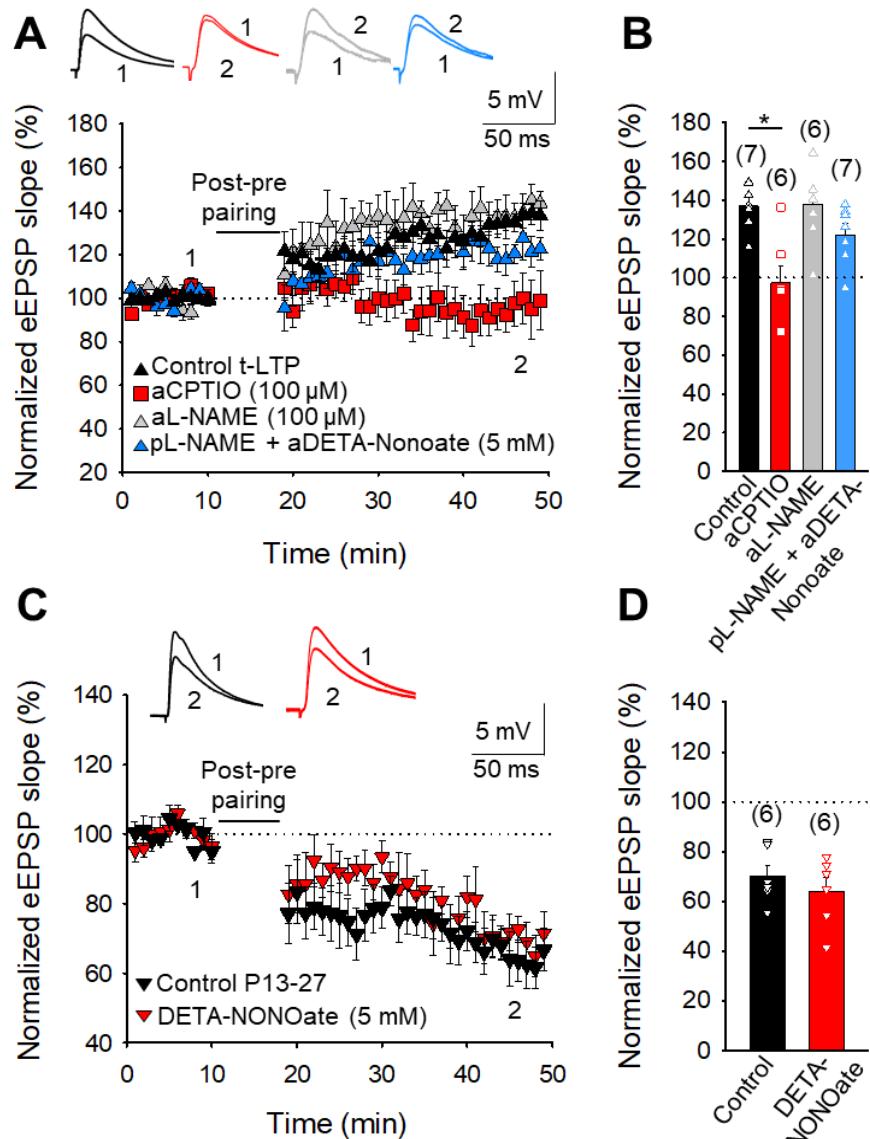


Figura 35. El NO es necesario para que los astrocitos liberen gliotransmisores e inducir la t-LTP. (A) La t-LTP fue prevenida con cPTIO (100 µM) en el astrocito, pero no con L-NAME (100 µM). Cuando se introdujo L-NAME en la neurona postsináptica y DETA-NONOate (5 mM) se agregó en forma de *puffs* sobre los astrocitos, la t-LTP se recuperó parcialmente. Se muestra el curso temporal de los eEPSP en rodajas control (triángulos negros), tratadas con aCPTIO (cuadrados rojos), aL-NAME (triángulos grises) y pL-NAME + DETA-NONOate (triángulos azules). Los trazos muestran los eEPSP antes de (1) y 30 min después del (2) protocolo de plasticidad. **(C)** El DETA-NONOate no afectó a la inducción de la t-LTD a la edad P13-27. Se muestran las pendientes de los eEPSP monitoreadas en condiciones de control (triángulos negros) y en rodajas expuestas a DETANONOate (5 mM, triángulos rojos). **(B, D)** Resumen de los resultados. Las barras indican la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra entre paréntesis. Test de Kruskal-Wallis: *p < 0.05.

Capítulo II: *Corteza entorinal y giro dentado*

CORTEZA ENTORRINAL Y GIRO DENTADO.

1. Inducción de t-LTD en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC.

En las sinapsis LPP-GC y MPP-GC no se ha descrito por el momento la existencia de t-LTD. Para determinar si en estas sinapsis es posible inducir t-LTD se monitorizaron eEPSP utilizando la técnica de *patch-clamp* en rodajas de ratones P13-21. La inducción de t-LTD se llevó a cabo pareando la actividad presináptica con un potencial de acción postsináptico ($\Delta t = -18$ ms), tal y como se hizo en la sinapsis L4-L2/3 en la corteza somatosensorial y como se ha descrito anteriormente en hipocampo (Andrade-Talavera et al., 2016; Pérez-Rodríguez et al., 2019; Falcón-Moya et al., 2020) (Figura 36B). Los eEPSP fueron provocados por la estimulación extracelular de las vías LPP y MPP, que conectan con las espinas dendríticas de la parte distal y medial de las células granulares (GC) del giro dentado de hipocampo (Savtchouk et al., 2019). Se registraron las células granulares del giro dentado (Figura 36A).

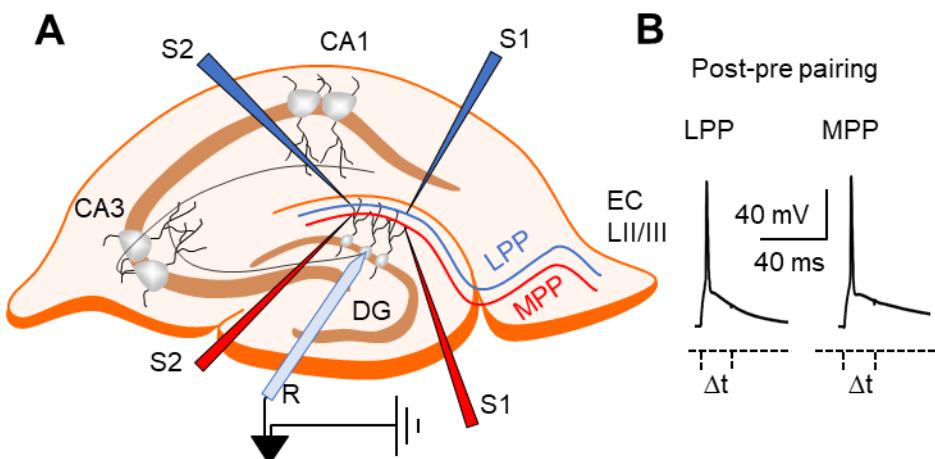


Figura 36. Esquema que muestra la configuración experimental general y el protocolo utilizado. **(A)** R, electrodo de registro; S1, electrodo de estimulación de la ruta pareada; S2, electrodo de estimulación de la ruta control Ambos se colocaron sobre los axones de la LPP y la MPP del giro dentado. **(B)** Protocolo *post-pre* utilizado (Δt , tiempo entre el inicio de los eEPSP y el segundo potencial) en LPP-GC y MPP-GC.

El protocolo *post-pre* indujo una clara t-LTD tanto en la sinapsis LPP-GC ($71 \pm 4\%$, n = 6, Figura 37A, B) como en la sinapsis MPP-GC ($66 \pm 6\%$, n = 6, Figura 37C, D); mientras que las ruta controles (no pareadas) no se vieron afectadas en ningún caso ($103 \pm 4\%$, n = 6 y $105 \pm 7\%$, n = 6, respectivamente, Figura 37A-D).

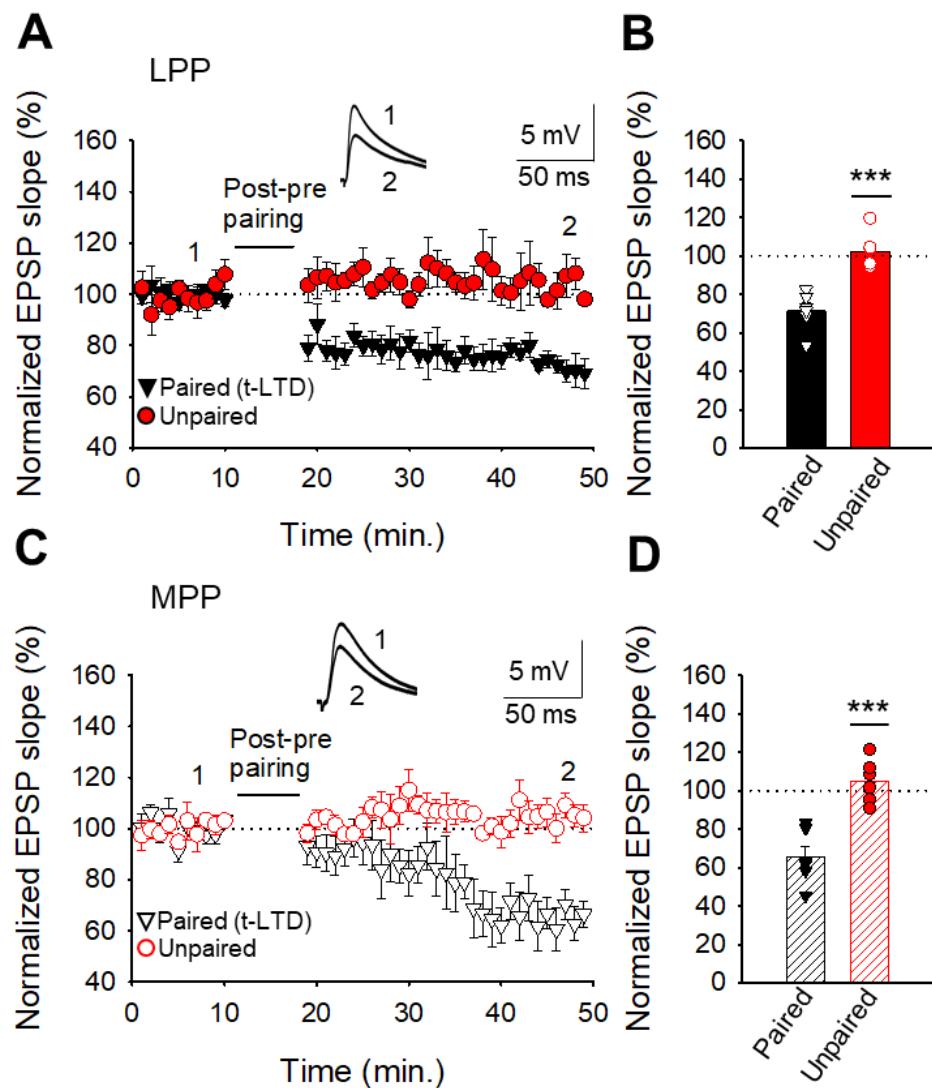


Figura 37. Un protocolo *post-pre* provocó t-LTD tanto en la sinapsis LPP-GC como en la sinapsis MPP-GC. (A, C) Se muestran las pendientes de los eEPSP monitorizadas en la ruta pareada (triángulos negros) y no pareada o control (círculos rojos). Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 min después (2) del protocolo de t-LTD. Solo en la ruta pareada se observó t-LTD. (B, D) Resumen de los resultados. Las barras representan la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra con símbolos sobre las barras. t de Student: *** p < 0.001.

2. Las t-LTDs observadas en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC son de expresión presináptica.

Se usaron varias aproximaciones como la PPR y el análisis del CV para determinar el locus de expresión de la t-LTD. Los resultados del análisis de PPR al inicio y 30 minutos después de la inducción de la t-LTD mostraron un aumento significativo de esta ratio en la sinapsis LPP-GC (línea base: $1.1 \pm 0.11\%$ frente a t-LTD: $1.6 \pm 0.18\%$, $n = 16$, Figura 38A) y MPP-GC (línea base: $1.16 \pm 0.08\%$ frente a t-LTD: $1.6 \pm 0.13\%$, $n = 19$, Figura 37C), lo que sugiere un cambio en la probabilidad de liberación. En segundo lugar, los resultados del CV con sustracción de ruido de las respuestas sinápticas antes y después de la inducción de la t-LTD se representan en las gráficas de CV^{-2} frente al cambio en la pendiente media de los EPSP evocados. Esta asociación da lugar a puntos por debajo de la diagonal tanto en la sinapsis LPP-GC como en la sinapsis MPP-GC (Figura 38B, D), indicativos de que la liberación presináptica está reducida (Sjöström et al., 2003; Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Brock et al., 2020). Estos parámetros evaluados sugieren que el locus de expresión de la t-LTD en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC es presináptico, y el protocolo *post-pre* podría disminuir la probabilidad de liberación del neurotransmisor.

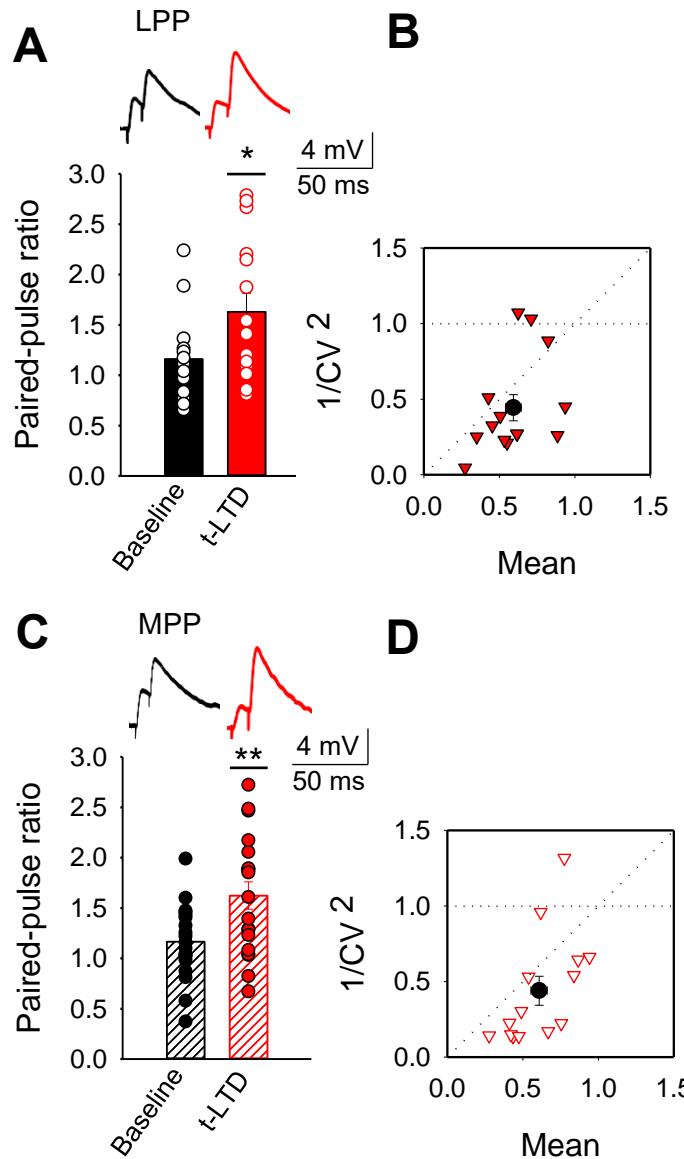


Figura 38. Expresión presináptica de la t-LTD en L2, L4 EC-GC. La PPR muestra un incremento después del protocolo *post-pre* tanto en la sinapsis LPP-GC (**A**) como en la sinapsis MPP-GC (**C**). Los trazos muestran pares de pulsos al inicio (en negro) y 30 min después (en rojo) de la inducción de la t-LTD (LPP-GC: $n = 16$; MPP-GC: $n = 19$). La gráfica normalizada de CV^{-2} frente a la media de la pendiente de los eEPSP produce puntos de datos principalmente por debajo de la diagonal después del protocolo de t-LTD tanto en la sinapsis LPP-GC (**B**) como en la sinapsis MPP-GC (**D**) (LPP-GC: $n = 14$; MPP-GC: $n = 13$). t de Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3. La t-LTD observada en la sinapsis MPP-GC se pierde a P22-28, no así la observada en la sinapsis LPP-GC.

Se estudió si la t-LTD que estaba presente en ambas sinapsis (LPP-GC y MPP-GC) a edades tempranas comprendidas entre P13-21 seguía presente en edades más tardías. Para ello, se aplicó el mismo protocolo de t-LTD, con un $\Delta t = -18$ ms. La t-LTD fue observada en la cuarta semana del desarrollo (P22-28) en la vía lateral ($76 \pm 11\%$, $n = 6$, Figura 39A), mientras que desapareció por completo en la vía medial (94 ± 6 %, $n = 6$, Figura 39B) a esta edad.

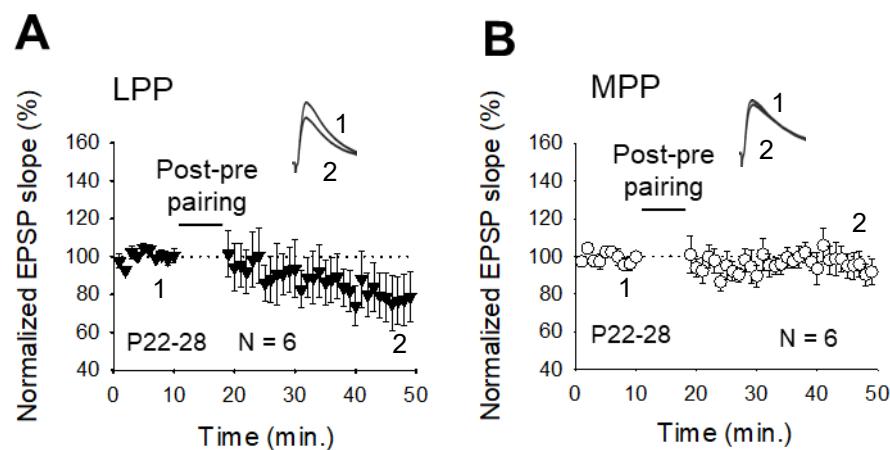


Figura 39. La t-LTD desaparece en la sinapsis MPP-GC en la cuarta semana del desarrollo, pero no en la sinapsis LPP-GC. (A) Se muestran las pendientes de los eEPSP monitorizadas en la sinapsis LPP-GC (triángulos negros) y **(B)** en la sinapsis MPP-GC (círculos blancos) tras la inducción del protocolo *post-pre*. Los trazos muestran los eEPSP durante la línea base (1) y 30 min después de la aplicación del protocolo de plasticidad (2).

4. La t-LTD requiere de NMDARs presinápticos en la sinapsis MPP-GC, pero no en la sinapsis LPP-GC.

Para determinar si estas formas de t-LTD requieren receptores de NMDA al igual que se ha descrito en otras sinapsis (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2010; Rodríguez-Moreno et al., 2013; Andrade-Talavera et al., 2016), se repitieron los experimentos en presencia de D-AP5 (50 μ M) y MK-801 (500 μ M). En estas condiciones experimentales, no se evitó la inducción de la t-LTD en la sinapsis LPP-GC (D-AP5: $66 \pm 4\%$, n = 8; MK-801: $62 \pm 9\%$, n = 6) frente a controles: $60 \pm 6\%$, n = 8, Figura 40A, B). Por otro lado, la inducción de t-LTD se previno en la sinapsis MPP-GC en presencia de D-AP5 ($90 \pm 7\%$, n = 10) y también fue prevenida en presencia de MK-801 ($107 \pm 10\%$, n = 6, Figura 40C, D). Posteriormente, se repitió el experimento introduciendo en la célula postsináptica MK-801 (500 μ M) y, en este caso, la inducción de la t-LTD no se vio afectada ($54 \pm 6\%$, n = 9 frente a los controles $60 \pm 7\%$, n = 8, Figura 40C, D). Estos resultados indican que la t-LTD no requiere de NMDARs en la sinapsis LPP-GC, pero sí en la sinapsis MPP-GC y que este tipo de receptores no se encuentran en la célula postsináptica.

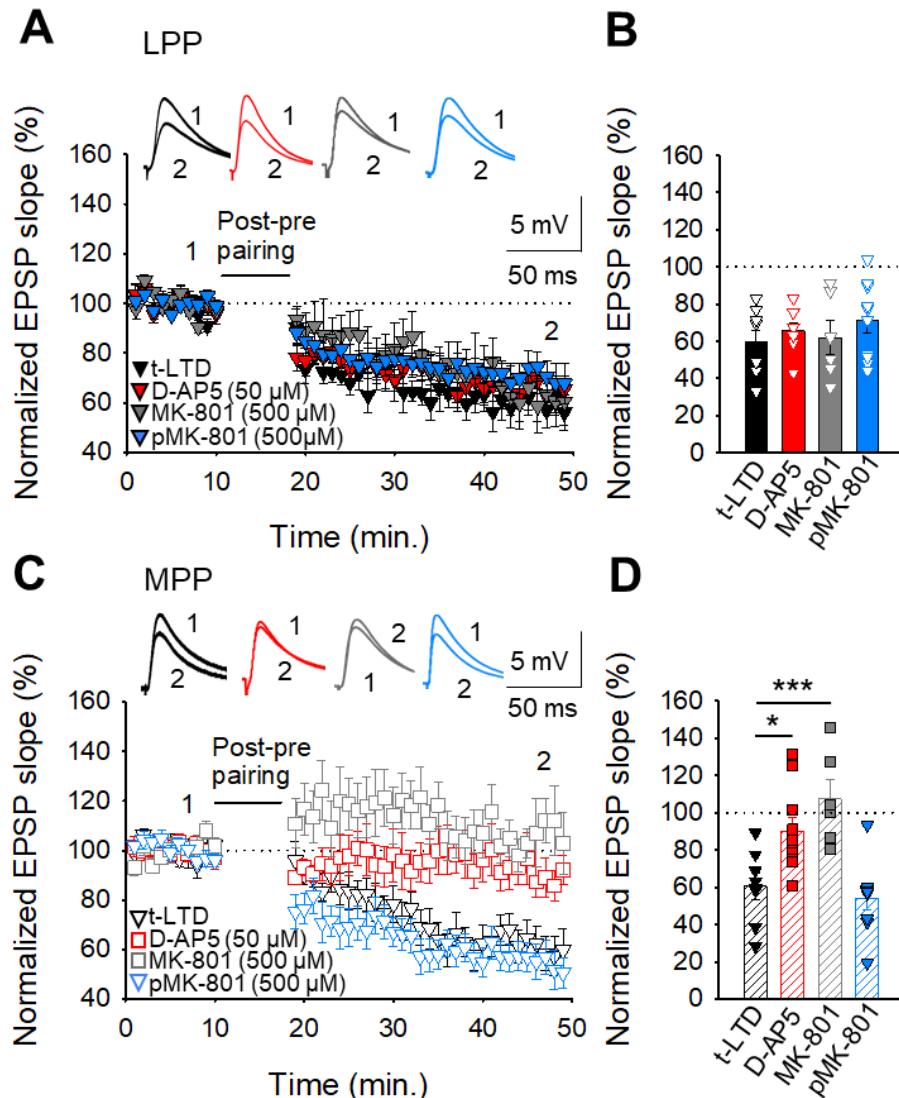


Figura 40. La t-LTD presináptica requiere de NMDARs en la sinapsis MPP-GC, pero no en la sinapsis LPP-GC. (A) LPP-GC: la adición de D-AP5 (50 μ M) o MK-801 (500 μ M) a la solución extracelular no previno la inducción de t-LTD. La pendiente de los eEPSP se muestra en las células tratadas con D-AP5 (triángulos rojos, n = 8), tratadas con MK-801 (triángulos grises, n = 6) y no tratadas (triángulos negros, n = 8). La inclusión de MK-801 en la célula postsináptica no bloqueó la t-LTD (triángulos azules, n = 10). (C) MPP-GC: en presencia de D-AP5 (cuadrados rojos sin relleno, n = 10) y MK-801 (cuadrados grises sin relleno, n = 6), la t-LTD se previno en comparación con las rodajas controles (triángulos negros sin relleno, n = 8). pMK-801 (triángulos azules sin relleno, n = 9) no impidió la inducción de la t-LTD. Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 min después (2) del protocolo de plasticidad. (B, D) Resumen de los resultados. Las barras representan la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra mediante símbolos sobre los histogramas. Test ANOVA de una vía + Holm-Sidak: *p < 0.05, ***p < 0.001.

Después de establecer que los NMDARs no postsinápticos están involucrados en la inducción de la t-LTD en la sinapsis MPP-GC, se determinó la composición de subunidades de los mismos. Para ello, se utilizó Zn²⁺ que es un antagonista de receptores tipo NMDA que contienen la subunidad GluN2A (Bidoret et al., 2009; Andrade-Talavera et al., 2016; Prius-Mengual, 2019). La presencia de Zn²⁺ (300 nM) en el baño previno la inducción de la t-LTD ($95 \pm 5\%$, n = 7, Figura 41A, B). Después de esto, se utilizó Ro 25-6981, un antagonista selectivo de los NMDARs que contienen la subunidad GluN2B (Mares et al., 2021). Ro 25-6981 (0.5 μM) no previno la inducción de t-LTD ($55 \pm 11\%$, n = 6, Figura 41A, B). También se estudió si los NMDARs que contienen las subunidades GluN2C/2D estaban involucrados en esta forma de t-LTD. Se repitieron los experimentos en presencia de PPDA (10 μM) en el baño (Chen et al., 2021) que no afectó a la inducción de la t-LTD ($61 \pm 7\%$, n = 6, Figura 41A, B).

Estos datos se compararon con los obtenidos de experimentos en rodajas control a las que se le aplicó el mismo protocolo de t-LTD sin usar ningún antagonista ($63 \pm 6\%$, n = 9, Figura 41A, B) e indican que los NMDARs presinápticos en la sinapsis MPP-GC, involucrados en la t-LTD, están compuestos por las subunidades GluN1 / GluN2A.

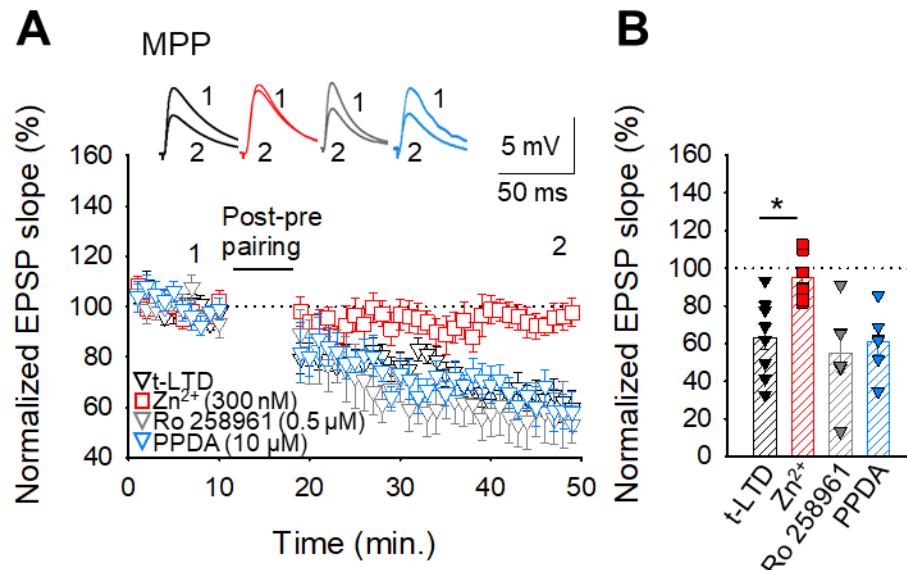


Figura 41. Composición de subunidades de los NMDARs involucrados en la t-LTD en la sinapsis MPP-GC. La composición de subunidades se determinó en presencia de Zn²⁺ (300 mM), Ro 25-6981 (0.5 μM) y PPDA (10 μM), antagonistas de NMDARs que contienen las subunidades GluN2A, GluN2B y GluN2C/D, respectivamente. **(A)** Curso temporal de la inducción de la t-LTD en condiciones control (triángulos negros sin relleno, n = 9), rodajas tratadas con Zn²⁺ (cuadrados rojos sin relleno, n = 7), Ro 25-6981 (triángulos grises sin relleno, n = 6) y PPDA (triángulos grises sin relleno, n = 6). Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 min después (2) del protocolo de plasticidad. **(B)** Resumen de los resultados. Las barras representan la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra mediante símbolos en los histogramas. Test ANOVA de una vía + Holm-Sidak: p* < 0.05.

5. La t-LTD presináptica requiere de mGluRs en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC.

Actualmente, se sabe que los mGluRs pueden modular la transmisión sináptica en la sinapsis establecida entre la vía perforante y el giro dentado (Dietrich et al., 1997), sin embargo, aunque existe información sobre la STDP y la contribución de los mGluRs a esta forma de plasticidad en la vía perforante, estos trabajos se basan en registros de campo o extracelulares (Lin et al., 2006), una técnica que no permite conocer a nivel celular este tipo de plasticidad. Por este motivo, se decidió investigar si la t-LTD requiere de mGluRs en estas sinapsis utilizando la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula completa.

En primer lugar, se empleó un antagonista de amplio espectro de mGluRs: LY341495 (100 μ M), que bloqueó la inducción de la t-LTD tanto en la sinapsis LPP-GC ($100 \pm 10\%$, n = 8, Figura 40A, B) como en la sinapsis MPP-GC ($99 \pm 9\%$, n = 10, Figura 42C, D). Posteriormente, las rodajas se trataron con el antagonista de los mGlu1Rs: LY36385 (100 μ M), y los resultados mostraron que la inducción de la t-LTD en la sinapsis LPP-GC no fue bloqueada ($76 \pm 3\%$, n = 6, Figura 42A, B); mientras que en la sinapsis MPP-GC sí lo fue ($95 \pm 7\%$, n = 7, Figura 42C, D). Además, la aplicación del antagonista específico de los mGluR5s MPEP (20 μ M) a la solución externa previno la inducción de la t-LTD en LPP-GC ($103 \pm 10\%$, n = 8, Figura 41A, B) pero no en MPP-GC ($61 \pm 7\%$, n = 6, Figura 42C, D), en comparación con las rodajas control (LPP: $68. \pm 7\%$, n = 8 y MPP: $65 \pm 7\%$, n = 9, Figura 42A-D). Estos resultados indican que tanto la sinapsis LPP-GC como la sinapsis MPP-GC requieren de mGluRs para inducir la t-LTD presináptica, sin embargo, mientras que en LPP-GC se necesita el receptor mGlu5, en MPP-GC se necesita el receptor mGlu1.

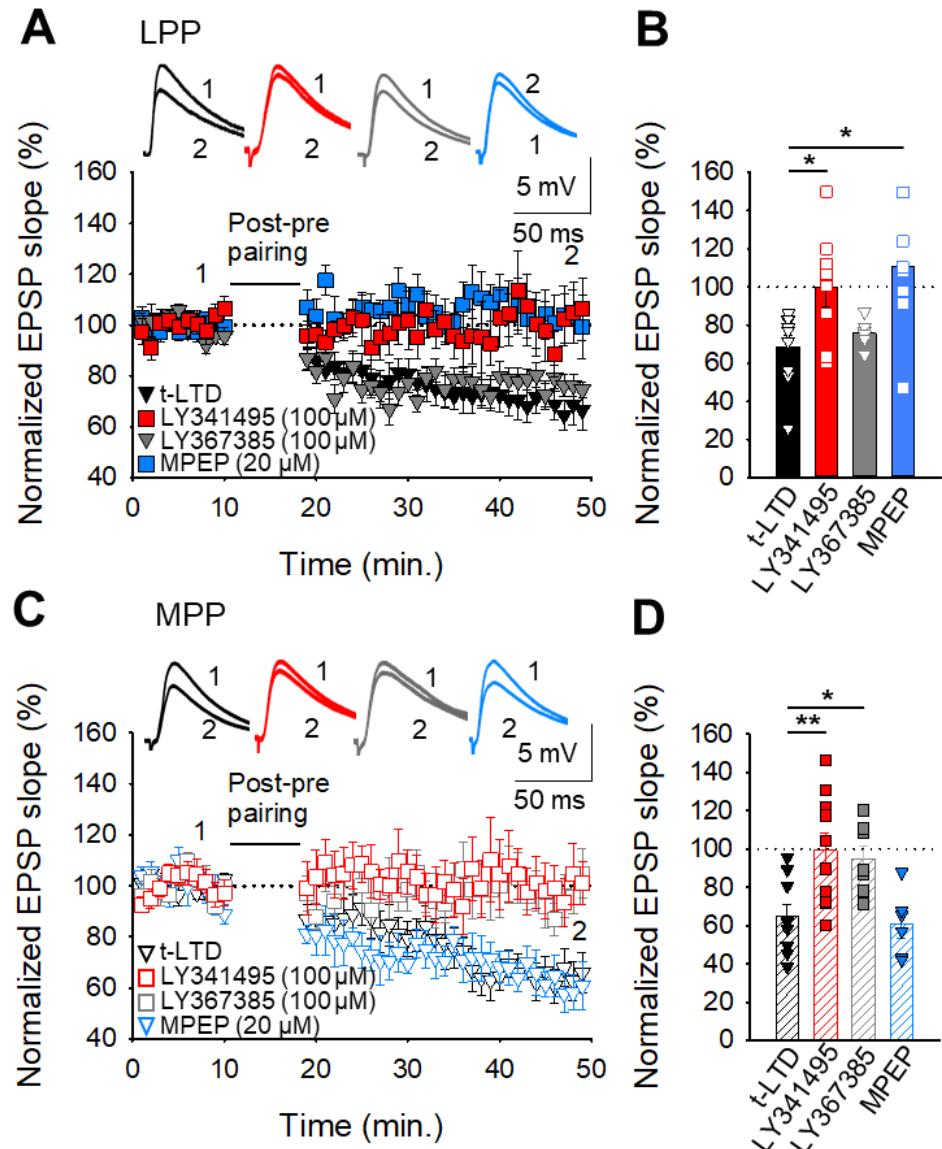


Figura 42. La t-LTD requiere de mGluRs en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC. (A) LPP-GC: la t-LTD requiere mGluR5 del grupo I. Se muestran las pendientes de los eEPSP monitorizadas en rodajas control (triángulos negros, n = 9) y tratadas con el antagonista general de mGluRs LY341495 (100 μM, cuadrados rojos, n = 8), el antagonista del mGluR1 del grupo I LY367385 (100 μM, triángulos grises, n = 6) y el antagonista mGluR5 del grupo I MPEP (500 μM, cuadrados azules, n = 8). Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 min después (2) del protocolo de plasticidad. (C) MPP-GC: t-LTD requiere de mGluR1 del grupo I. Curso temporal de la t-LTD en controles (triángulos negros sin relleno, n = 9) y en rodajas tratadas con LY341495 en el baño (cuadrados rojos sin relleno, n = 10), LY367385 (cuadrados grises sin relleno, n = 7) y MPEP (triángulos azules sin relleno, n = 6). (B, D) Resumen de los resultados. Las barras representan la media y el error estándar. El número de rodajas se muestra mediante símbolos sobre las barras. Test ANOVA de una vía + Holm-Sidak: *p < 0.05, **p < 0.01.

Se repitieron los experimentos introduciendo GDP β S (1 mM) en la neurona postsináptica para inhibir la señalización mediada por proteínas G e identificar la posible ubicación de los mGluRs involucrados en la inducción de t-LTD en la vía perforante. Los resultados mostraron que la t-LTD no se vio afectada cuando las células postsinápticas fueron tratadas con GDP β S tanto en la sinapsis LPP-GC ($61 \pm 11\%$, n = 6, Figura 43A, B) como en la sinapsis MPP-GC ($69 \pm 6\%$, n = 7, Figura 43C, D) en comparación con rodajas controles no tratadas (LPP: $67 \pm 7\%$, n = 7; MPP: $62 \pm 8\%$, n = 7, Figura 43A-D). Esta información indica que los mGluRs requeridos para la inducción de t-LTD no están situados en la célula postsináptica, pudiendo estar situados en la célula presináptica o en los astrocitos.

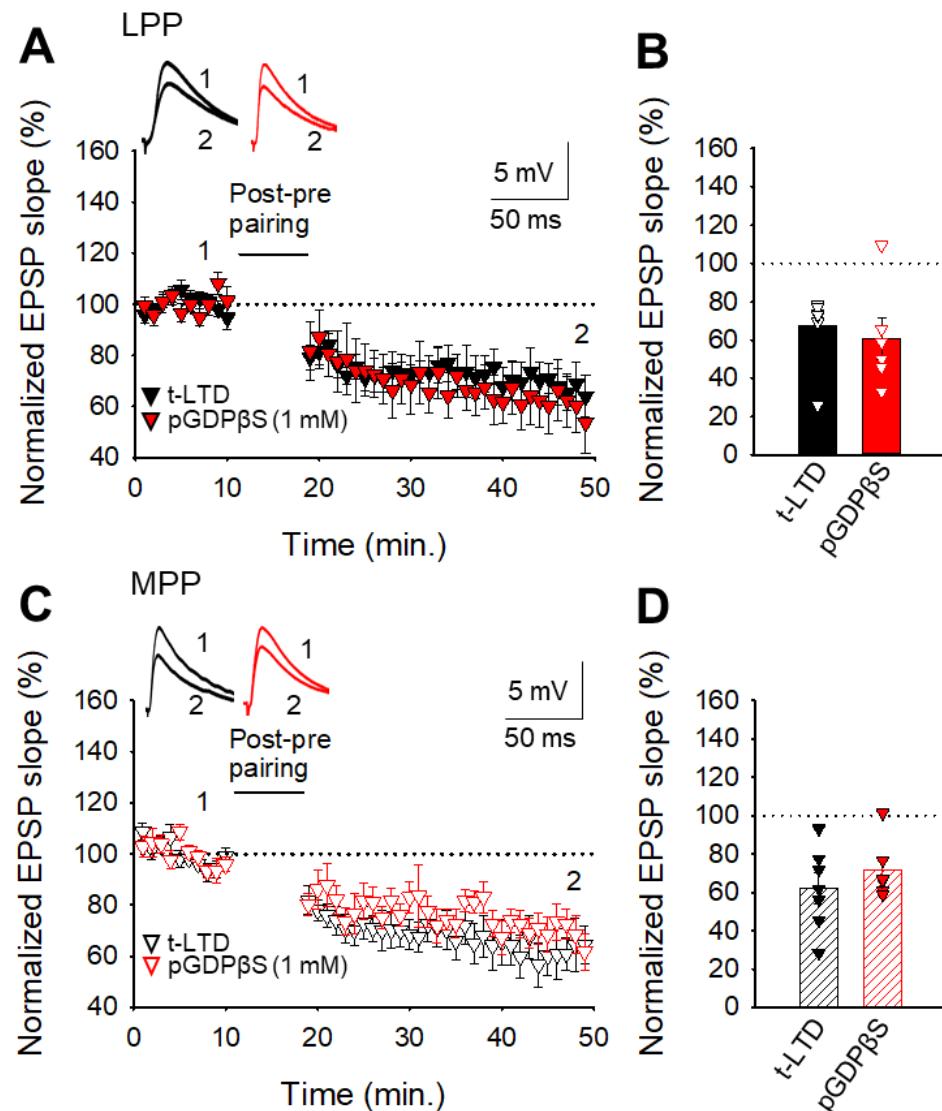


Figura 43. Los mGluRs involucrados en la t-LTD en la PP no se encuentran en la célula postsináptica. (A) LPP-GC: curso temporal de la inducción de la t-LTD en condiciones control (triángulos negros, n = 7) o con la célula postsináptica tratada con GDP β S (1 mM) (triángulos rojos, n = 6). (C) MPP-GC: la inclusión de GDP β S en la célula postsináptica (triángulos rojos sin relleno, n = 6) no impidió la inducción de la t-LTD, que existe bajo condiciones de control (triángulos negros sin relleno, n = 7). Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 min después de la inducción de la t-LTD (2). (B, D) Resumen de los resultados. Las barras representan la media y el error estándar. El número de rodajas se representa mediante símbolos sobre las barras.

6. La inducción de t-LTD requiere de señalización cannabinoides en las sinapsis PP-GC.

El sistema endocannabinoide (eCB) juega un papel fundamental en la plasticidad sináptica a través de una vía de señalización retrógrada (Castillo, 2012). En la STDP se ha observado que la actividad neuronal conduce a la producción de endocannabinoides (Andrade-Talavera et al., 2016; Falcón-Moya et al., 2020) y se sabe que la actividad del receptor CB₁ cambia a lo largo del neurodesarrollo en todo el cerebro (Martínez et al., 2020). Se determinó si los receptores CB₁ son necesarios para la inducción de t-LTD.

Con este propósito, se trataron las rodajas con tetrahidrolipstatina (THL, 5 µM) en la neurona postsináptica para inhibir el diacilglicerol lipasa y evitar la síntesis de eCBs. THL impidió casi por completo la inducción de la t-LTD tanto en la sinapsis LPP-GC ($92 \pm 7\%$, n = 8 frente a controles $68 \pm 4\%$, n = 8, Figura 44A, B) como en la sinapsis MPP-GC ($92 \pm 5\%$, n = 8 frente a controles $67 \pm 5\%$ n = 8, Figura 44A, B). Se repitió el experimento en presencia del antagonista de los receptores CB₁ AM251, 3 µM y la inducción de la t-LTD se previno tanto en la sinapsis LPP-GC ($102 \pm 7\%$, n = 14, Figura 44A, B) como en la sinapsis MPP-GC ($98 \pm 5\%$, n = 6, Figura 44A, B). Por lo tanto, la t-LTD requiere de la síntesis de eCBs por parte de las células postsinápticas en la vía perforante y de la activación de receptores CB₁.

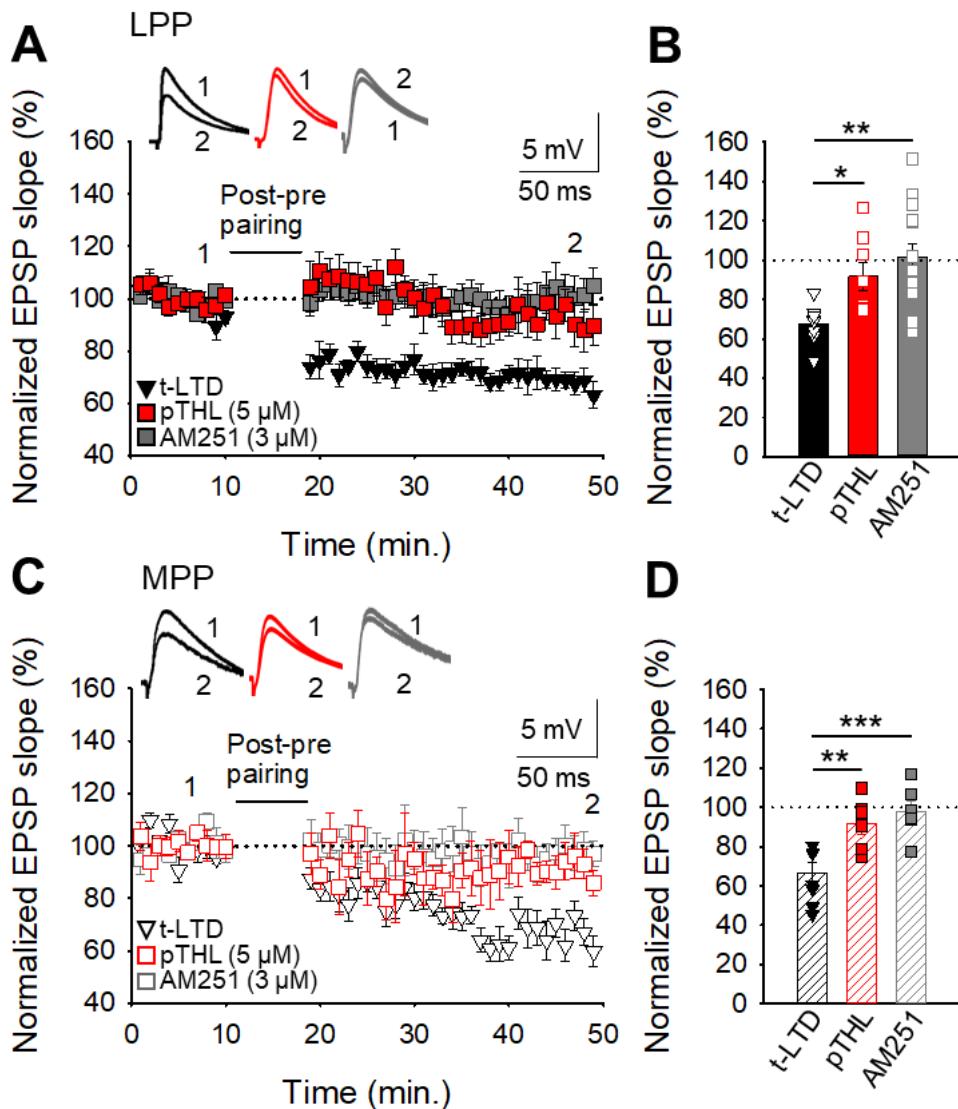


Figura 44. t-LTD requiere señalización endocannabinoide. (A, C) Curso temporal de la inducción de la t-LTD en condiciones control (LPP-GC: triángulos negros, n = 8; MPP-GC: triángulos negros sin relleno, n = 8). En presencia de pTHL, se previno la t-LTD (LPP-GC: cuadrados rojos, n = 8; MPP-GC: cuadrados rojos sin relleno, n = 6). Las rodajas tratadas con el antagonista del receptor CB₁ AM251 (3 µM) muestran un bloqueo de la t-LTD después del protocolo post-pre (LPP-GC: cuadrados grises, n = 14; MPP-GC: cuadrados grises vacíos, n = 6). Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 min después de la aplicación del protocolo de plasticidad (2). (B, D) Resumen de los resultados. Las barras representan la media y el error estándar. El número de rodajas se indica mediante símbolos sobre las barras. Test ANOVA de una vía + Holm-Sidak: *p<0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

7. La t-LTD requiere de actividad astrocitaria en las sinapsis PP-GC.

Varios estudios sugieren que la activación de los receptores CB₁ aumenta las ondas de Ca²⁺ en los astrocitos y que son necesarios para la liberación de gliotransmisores por mecanismos vesiculares (Min y Nevian, 2012; Andrade-Talavera et al., 2016; Falcón-Moya et al., 2020). Un gliotransmisor liberado por los astrocitos es el glutamato, que está involucrado en la plasticidad sináptica en el neocórtex y el hipocampo (Zhang et al., 2004; Bonansco et al., 2011; Padamsey et al., 2017; Falcón-Moya et al., 2020). Se decidió investigar si el glutamato liberado por los astrocitos está involucrado en la t-LTD observada en sinapsis PP-GC.

En primer lugar, se pudo inducir t-LTD en rodajas de ratones control o WT (LPP-GC: 64 ± 5 %, n = 9; MPP-GC: 60 ± 4 %, n = 8, Figura 45A-D); mientras que la inducción de t-LTD cuando se introdujo el quelante de calcio BAPTA (20 mM) en los astrocitos resultó impedita (LPP-GC: 102 ± 9 %, n = 6; MPP-GC: 92 ± 6 %, n = 7; Figura 45A-D). En segundo lugar, se utilizaron rodajas de ratones transgénicos dn-SNARE en las cuales no se pudo inducir t-LTD no se pudo inducir (LPP-GC: 102 ± 9 %, n = 9; MPP-GC: 112 ± 6 %, n = 7; Figura 45A-D). Para determinar si el glutamato liberado por los astrocitos está involucrado en la t-LTD, se aplicaron “puffs” de glutamato (100 µM) en rodajas de ratones dn-SNARE y se recuperó la t-LTD en ambas sinapsis (LPP-GC: 72 ± 11 %, n = 6; MPP-GC: 69 ± 8 %, n = 6, Figura 45A-D). Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la t-LTD presináptica en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC requiere de señalización astrocitaria y liberación de glutamato que puede ser responsable de activar NMDARs y mGluRs presinápticos.

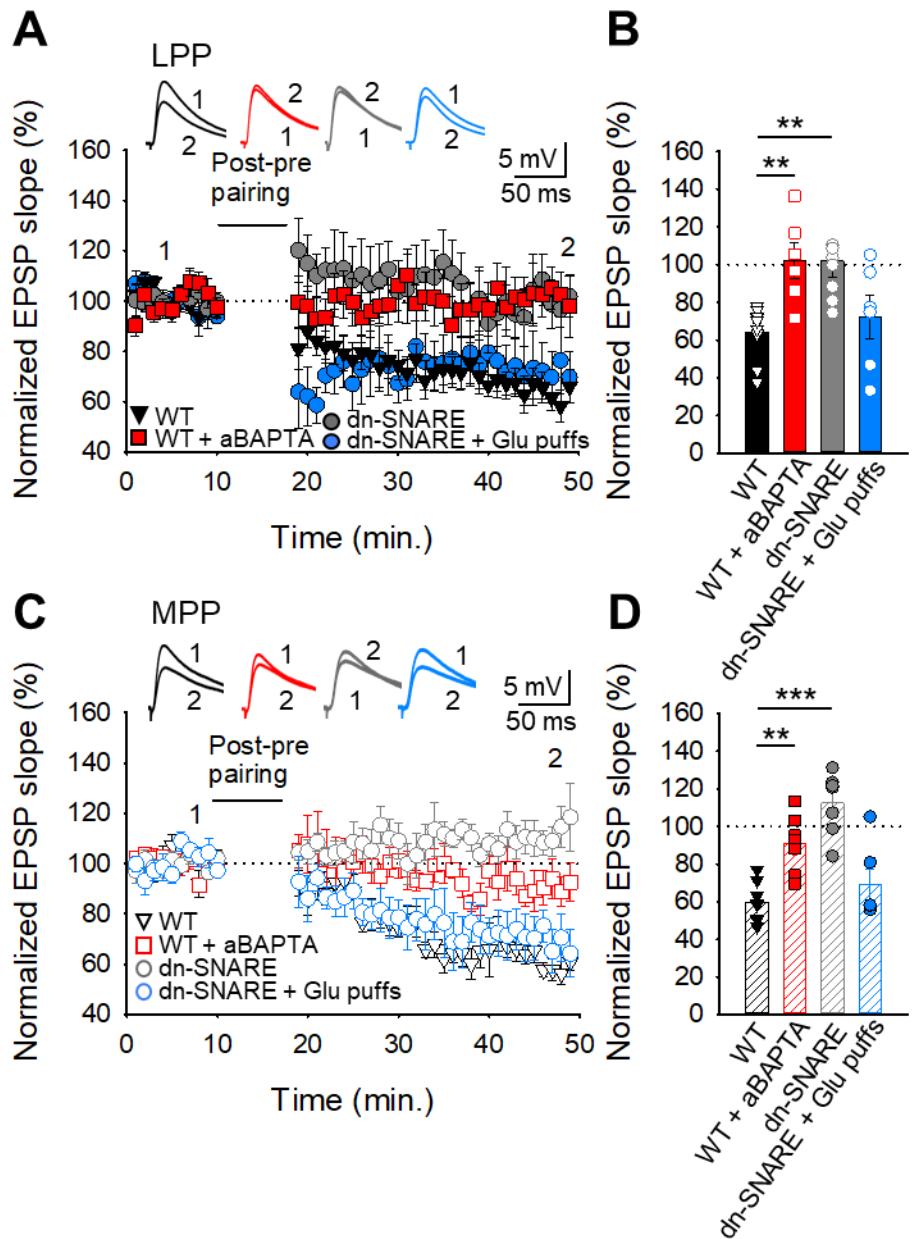


Figura 45. t-LTD requiere de la liberación de glutamato por los astrocitos en las sinapsis PP-GC. (A, B) Curso temporal de la inducción de t-LTD en rodajas de ratones WT (LPP-GC: triángulos negros, n = 9; MPP-GC: triángulos negros sin relleno, n = 8), WT con BAPTA (20 mM) en los astrocitos (LPP-GC: cuadrados rojos, n = 6; MPP-GC: cuadrados rojos sin relleno, n = 7), rodajas de ratones dn-SNARE (LPP-GC: círculos grises, n = 9; MPP-GC: círculos grises sin relleno, n = 7); y rodajas de ratones dn-SNARE expuestos a aplicaciones locales de glutamato (100 μ M) (LPP-GC: círculos azules, n = 6; MPP-GC: círculos azules sin relleno, n = 6). Los trazos muestran los eEPSP antes (1) y 30 min después del protocolo post-pre (2). **(B, D)** Resumen de los resultados. Las barras de error representan la media y el error estándar. El número de rodajas utilizadas se muestra con símbolos sobre las barras. Test ANOVA de una vía + Holm-Sidak: **p < 0.01, ***p < 0.001.

V. Discusión

Capítulo I: *Corteza somatosensorial*

CORTEZA SOMATOSENSORIAL.

1. La t-LTD se pierde al final de la cuarta semana del neurodesarrollo postnatal en la sinapsis L4-L2/3.

Aplicando un protocolo *post-pre*, con una diferencia de -18 ms entre la actividad presináptica y la postsináptica, se observó que la t-LTD en la sinapsis L4-L2/3 a edades comprendidas entre P13-27 se expresa de forma presináptica (Figura 46A) y que desaparece a partir de P27, como se publicó anteriormente (Banerjee et al., 2009). También es consistente con anteriores estudios que mostraron que la capacidad de inducir depresión sináptica en las sinapsis corticales y en el hipocampo disminuye con la edad (Bear y Abraham, 1996; Corlew et al., 2007; Banerjee et al., 2009; Rodríguez-Moreno et al., 2013; Andrade-Talavera et al., 2016; Pérez-Rodríguez et al., 2019).

Del mismo modo, se observó una pérdida de la t-LTD a edades P28-37 usando dos intervalos de tiempo diferentes entre la actividad presináptica y la postsináptica (25 y 10 ms) y en ambos casos desapareció la t-LTD, tal y como ocurría con 18 ms. No se probaron otros intervalos de tiempo, pero estos datos indican que un cambio en las ventanas temporales no interviene en la pérdida de la t-LTD asociada con el desarrollo cerebral. Estos resultados extienden la pérdida de la t-LTD que se ha observado en otras regiones del cerebro -como la corteza visual y el hipocampo- a la corteza somatosensorial. Sería de interés estudiar si este mecanismo se repite al estudiar otras regiones cerebrales y es, por tanto, un mecanismo general.

2. La pérdida de la t-LTD con el desarrollo en la sinapsis L4-L2/3 involucra un aumento de la inhibición mediada por la activación de receptores presinápticos de adenosina de tipo A₁.

En el presente trabajo, se ha mostrado que se requiere un aumento de la inhibición para cerrar la ventana de plasticidad. Esta mayor inhibición no está mediada por la activación de los receptores de tipo GABA_A, como se ha descrito en otras regiones como la corteza visual (Hensch,

2004, 2005), donde los astrocitos fueron recientemente implicados en el cierre del período crítico de plasticidad (Ribot et al., 2021). Los receptores de tipo GABA_B tampoco están involucrados en esta pérdida de t-LTD, que no se vio afectada por la presencia de los antagonistas de los receptores GABA_A o GABA_B en ratones P27-38.

Sin embargo, la t-LTD no desaparece durante el desarrollo cerebral en presencia de un antagonista de los A₁Rs, lo cual es una indicación clara del papel crucial que tiene la adenosina en la t-LTD. Además, al activar los A₁Rs a P13-27 (cuando se puede inducir una t-LTD de más del 30%) la ventana de plasticidad se cerró prematuramente y hubo una pérdida de la t-LTD análoga a la observada en ratones de mayor edad (P27-38). Este mecanismo es similar al observado recientemente en el hipocampo (Falcón-Moya et al., 2020), sugiriendo que las dos estructuras utilizan un mecanismo parecido para cerrar una ventana de plasticidad. Por eso, resulta de interés estudiar estos mecanismos en otras sinapsis para confirmar si se trata de un fenómeno general extrapolable a otras regiones cerebrales.

La explicación más probable sobre la pérdida de la t-LTD es que la activación presináptica de los A₁Rs produce una disminución de la liberación de glutamato (Dunwiddie y Masino, 2001). En el actual estudio, se partió de dos aproximaciones diferentes para determinar si la adenosina actúa sobre A₁Rs presinápticos: análisis de PPR y análisis de CV, los cuales fueron consistentes con la actividad presináptica de A₁Rs. Como se observó en el hipocampo (Sebastião et al., 2000; Rex et al., 2005; Kerr et al., 2013; Falcón-Moya et al., 2020), la concentración de adenosina en las sinapsis de la corteza somatosensorial L4-L2/3 parece aumentar con el neurodesarrollo, observándose un aumento mayor en la pendiente de los eEPSP inducido por 8-CPT a P28-37 que el observado a P13-27. Así, al igual que ocurre con la sinapsis CA3-CA1 del hipocampo, parece que el incremento en la activación de los A₁Rs presinápticos durante el desarrollo cerebral es debido al aumento de la adenosina extracelular. Esta activación inhibe la liberación de glutamato, reduciendo el glutamato ambiental y posiblemente la activación de los NMDARs que es necesaria para la t-LTD, provocando su pérdida. Por lo tanto, el incremento de los niveles de adenosina parece afectar a la liberación de glutamato y la inducción de la t-LTD (Figura 46B).

3. La adenosina que se libera como resultado de la señalización de los astrocitos es necesaria para la pérdida de plasticidad durante el neurodesarrollo.

Resulta de interés identificar cuál es la fuente específica de adenosina, ya que hay muchas posibilidades. La adenosina puede ser liberada de las neuronas por exocitosis (Klyuch et al., 2012) o a través de transportadores (Lovatt et al., 2012), indirectamente a través del metabolismo extracelular del ATP exocitado por las neuronas (Jo y Schlichter, 1999) o las células gliales (Pascual et al., 2005) o a través de hemicanales de unión glial (Huckstepp et al., 2010). De hecho, estos mecanismos también pueden operar de forma concomitante.

Se estudió si se necesitan astrocitos para producir la adenosina que activa los A₁Rs, ya que son una fuente potencial bien conocida de adenosina (principalmente en forma de su precursor, ATP) y otros gliotransmisores, liberados después de la movilización de Ca²⁺ de las vesículas astrocíticas (Araque et al., 2014). A la edad de P28-37, la prevención de la liberación de vesículas mediante la introducción de BAPTA en los astrocitos recuperó la t-LTD, un efecto que fue bloqueado añadiendo CPA. Este experimento demostró que la adenosina liberada por los astrocitos -o como resultado de la señalización de los astrocitos- es necesaria para que se produzca la pérdida de la t-LTD. Aunque sólo se trató un astrocito específico con BAPTA, el efecto observado sobre la plasticidad probablemente se deba a la activación de una red de astrocitos, ya que el único astrocito tratado se conecta a otros a través de uniones comunicantes o conexinas por las cuales se propagan las oscilaciones en los niveles de Ca²⁺ intracelular (Mederos et al., 2018).

Por otro lado, también se observó que la estimulación directa de los astrocitos aumenta lo suficiente la adenosina extracelular como para afectar a la pendiente de los eEPSP, lo que a su vez afecta a la liberación de glutamato. Si el aumento de adenosina extracelular observado con el desarrollo (aquí y previamente en el hipocampo) se produce por un aumento en el número de astrocitos o por una mayor liberación es una cuestión que requiere de más estudio. Los resultados de este trabajo indican que la t-LTD está presente en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial del ratón hasta el final de la cuarta semana del neurodesarrollo. La desaparición de esta forma de t-LTD se debe a la inhibición mediada por la activación de los A₁Rs presinápticos durante la maduración cerebral. Así, la implicación de la adenosina en el cierre de ventanas de

plasticidad se perfila como un evento regulador común dado que también se ha observado en el hipocampo (Pérez-Rodríguez et al., 2019) y se ha visto que la adenosina es capaz de producir un cambio de t-LTD a t-LTP a P38-60.

4. La t-LTD cambia a t-LTP presináptica a P38-60.

En la segunda parte de este estudio, se mostró que la t-LTD de expresión presináptica cambia a t-LTP en la sinapsis somatosensorial de L4-L2/3 a medida que los ratones jóvenes maduran. Esta forma de t-LTP se expresa presinápticamente y requiere de mGluR1s y de la activación de NMDARs. Además, esta t-LTP presináptica necesita el flujo de calcio a través de los canales de Ca^{2+} de tipo L postsinápticos, así como la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares postsinápticos y la liberación de NO postsináptico. Este último actúa como una señal retrógrada que media la liberación astroglial de ATP/adenosina para activar los A₁Rs presinápticos y la de glutamato para activar presumiblemente a los NMDARs (Figura 46C).

En el trabajo realizado en la presente memoria, se muestra la evidencia de dos aproximaciones para determinar el sitio de expresión de esta forma de t-LTP: PPR y CV, ambos consistentes con cambios presinápticos. Por lo tanto, esta LTP expresada presinápticamente aparece durante el desarrollo a partir de un protocolo que normalmente induce t-LTD, de modo que estos hallazgos expanden el repertorio de LTPs presinápticas a la sinapsis L4-L2/3. Al estudiar la dependencia del tiempo de esta forma de t-LTP, el cambio de t-LTD a t-LTP ocurrió en diferentes intervalos de tiempo (18 y 10 ms) a la edad de P38-60, donde antes había una t-LTD clara a edades comprendidas entre P13-27. Por lo tanto, este cambio parece surgir durante el neurodesarrollo y lo más probable es que no se deba a una ampliación del intervalo de tiempo o un cambio a lo largo del eje del tiempo, aunque no se puede descartar la posibilidad de que el cambio no ocurra si se usan otros intervalos de tiempo que no han sido estudiados todavía. Una pregunta relevante que debería abordarse es si este cambio de t-LTD a t-LTP se observa solo con un protocolo de STDP o si también podría estar presente cuando se usan otros protocolos que inducen LTD en animales jóvenes.

Cabe señalar que se ha sugerido que la STDP depende de la concentración de calcio extracelular $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en el hipocampo, pues donde la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ se considera que es fisiológica (1.3–

1.8 mM) la plasticidad se ve afectada (Inglebert et al., 2020). En la corteza somatosensorial estudiada, la $[Ca^{2+}]_e$ es ligeramente superior al intervalo indicado (2 mM), no obstante, tanto la t-LTD como el cambio a t-LTP se produjeron en presencia de 2 mM y también de 1.5 mM de $[Ca^{2+}]_e$, sugiriendo que ambos efectos muy probablemente se producirán bajo concentraciones fisiológicas de $[Ca^{2+}]_e$. Esto también es consistente con el hecho de que la t-LTD en la sinapsis de L4-L2/3 de la corteza somatosensorial se ha observado *in vivo* en ratones jóvenes (González-Rueda et al., 2018). En consecuencia, sería particularmente interesante determinar si este cambio de t-LTD a t-LTP ocurre *in vivo*.

5. La t-LTP de expresión presináptica requiere de NMDARs y mGluR1s.

En cuanto a los tipos de receptores necesarios para que se pueda inducir la t-LTP presináptica a medida que el cerebro del animal madura, se encontraron algunas diferencias claras entre el hipocampo y la corteza somatosensorial. Aunque ambos tipos de t-LTP se expresan presinápticamente, la t-LTP requiere de NMDARs en la sinapsis L4-L2/3 de S1 pero no en el hipocampo. Esta es una diferencia interesante ya que se ha encontrado una disminución en el número de NMDARs presinápticos en la corteza visual con el neurodesarrollo (Corlew et al., 2007) y en el hipocampo (Pérez-Rodríguez et al., 2019). Aunque aún no se ha descrito un posible cambio de t-LTD presináptica a t-LTP presináptica en la corteza visual, este cambio se asocia con una falta de actividad presináptica de los NMDARs en el hipocampo. Esto podría indicar que el número de NMDARs es demasiado bajo, por lo que no pueden participar en la t-LTP, participando los mGluR5s en su lugar (Pérez-Rodríguez et al., 2019; Falcón-Moya et al., 2020). Futuros experimentos tendrán que determinar si también se producen cambios en el número de preNMDARs en la sinapsis de L4-L2/3 de la corteza somatosensorial con el desarrollo cerebral. También puede ocurrir que exista un curso temporal diferente para la maduración cortical y la del hipocampo, como se ha indicado en las cortezas visual y somatosensorial (Cheetham y Fox, 2010).

Otra posible explicación para estas diferencias regionales es que el aumento de la activación de los A₁Rs en el hipocampo con el desarrollo cerebral reduce la probabilidad de liberación de glutamato, de modo que se libera una cantidad insuficiente de glutamato y no se activan los preNMDARs; sin embargo, junto con el glutamato liberado por los astrocitos, alcanza

un nivel capaz de activar los mGluRs presinápticos necesarios para t-LTP, pero no para los preNMDARs.

En el trabajo que aquí se presenta, se ha descrito un mecanismo similar al hipocampo en la sinapsis L4-L2/3, mediante el cual la activación presináptica de A₁Rs amortigua la liberación de glutamato, aunque la cantidad liberada junto con el glutamato liberado por los astrocitos todavía es capaz de activar los mGluRs y, probablemente, los preNMDARs. Sin embargo, es evidente que se necesitan más experimentos para aclarar los eventos que subyacen a estos cambios. En el hipocampo, se requiere del mGluR5 presináptico para inducir la t-LTP presináptica (Falcón-Moya et al., 2020), donde estos receptores modulan la liberación de glutamato (Rodríguez-Moreno et al., 1998) y la plasticidad (Gómez-Gonzalo et al., 2015). Aquí, y a diferencia del hipocampo, se encontró que es probable que los mGlu1Rs postsinápticos sean necesarios para la t-LTP expresada presinápticamente que se encuentra en las sinapsis L4-L2/3 de corteza somatosensorial. En el hipocampo se encontró previamente un cambio asociado con el desarrollo cerebral de la participación de los NMDARs a los mGluRs en la plasticidad (Falcón-Moya et al., 2020). Aunque no se encontró lo mismo aquí en la sinapsis cortical L4–L2/3, donde tanto los NMDARs como los mGluRs están involucrados en la t-LTP.

Un aspecto que queda claro a partir de los resultados que se muestran en la presente memoria, es que se ha detectado una nueva forma de t-LTP presináptica, extendiendo la existencia de formas presinápticas de LTP a la corteza somatosensorial. Se han descrito formas de LTPs presinápticas que involucran NMDARs en el hipocampo (McGuinness et al., 2010) y en la corteza entorinal para las sinapsis del giro dentado (Min et al., 1998; Jourdain et al., 2007; Pérez-Otaño y Rodríguez-Moreno, 2019; Savtchouk et al., 2019), y también se han descrito formas de LTPs presinápticas independientes de NMDARs en la sinapsis CA3 de la fibra musgosa (MF) del hipocampo (Nicoll y Schmitz, 2005), así como en el cerebelo (Salin et al., 1996), tálamo (Castro-Alamancos y Calcagnotto, 1999), subículo (Behr et al., 2009), amígdala (López de Armentia y Sah, 2007) y neocórte (Chen et al., 2009). Aunque se había descrito que los mGluRs eran necesarios para algunas formas de LTPs presinápticas en el hipocampo (Perea y Araque, 2007; Gómez-Gonzalo et al., 2015), dicha LTP presináptica no se indujo con protocolos de STDP.

6. La t-LTP de la corteza somatosensorial requiere de calcio postsináptico y NO.

Al igual que con otras formas de LTP, incluida la t-LTP en el hipocampo, la t-LTP requiere de un aumento de Ca^{2+} en la célula postsináptica y la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares (Castillo, 2012; Padamsey y Emptage, 2014; Padamsey et al., 2017; Falcón-Moya et al., 2020; Mateos-Aparicio y Rodríguez-Moreno, 2020). Estas características de la t-LTP cortical también son comunes a otras formas de LTP presinápticas (Matyash et al., 2001; Navarrete et al., 2014), y se sabe que los mGluRs postsinápticos reclutan depósitos de calcio postsinápticos.

Se encontró que el NO es la señal retrógrada producida por la neurona postsináptica vía aumento de Ca^{2+} como en otros tipos de LTP presinápticas (Castillo, 2012; Padamsey y Emptage, 2014; Padamsey et al., 2017; Falcón-Moya et al., 2020; Mateos-Aparicio y Rodríguez-Moreno, 2020). La t-LTP se previno incluyendo cPTIO en el astrocito, pero no con L-NAME. Por tanto, se concluye que el NO que participa en esta forma de t-LTP no es sintetizado por los astrocitos, sino que es liberado por la neurona postsináptica y parece entrar en los astrocitos para estimular o modular la liberación de gliotransmisores.

7. La t-LTP presináptica requiere de señalización de astrocitos.

Se demostró la participación de los astrocitos en la t-LTP presináptica a través de dos aproximaciones diferentes. En primer lugar, la introducción de BAPTA en los astrocitos impidió la inducción de t-LTP. En segundo lugar, la liberación vesicular está alterada en ratones (dn)-SNARE y no se observó la t-LTP en las rodajas de estos animales. Se ha demostrado previamente que los astrocitos participan en la potenciación sináptica (Jourdain et al., 2007; Perea y Araque, 2007; Savtchouk et al., 2019), pero no como resultado de un cambio de LTD presináptica a LTP presináptica como se ha visto en este estudio en la sinapsis de L4-L2/3.

Se descubrió que el aumento de inhibición de la liberación como resultado de la activación de los A₁Rs presinápticos por adenosina es el responsable del cambio de t-LTD a t-LTP durante la sexta semana del neurodesarrollo. Además, la activación de los A₁Rs presinápticos a P13-27

convierte la t-LTD en t-LTP, confirmando la importancia de la adenosina y de los A₁Rs presinápticos en el cambio de plasticidad observado, como también se ha descrito para el hipocampo (Falcón-Moya et al., 2020).

Tal como se ha publicado recientemente en el hipocampo, los datos de esta investigación en corteza somatosensorial sugieren que la adenosina probablemente se origina en los astrocitos. Sin embargo, al igual que ocurre para la pérdida de la t-LTD, aunque los astrocitos participan claramente en este evento -posiblemente al liberar adenosina-, también puede haber otras fuentes de este nucleósido (Manzoni et al., 1994). El aumento de la adenosina extracelular a medida que madura la corteza de barriles podría deberse a un mayor número de astrocitos o a una mayor liberación, lo cual queda aún por definir. Como se indicó, puede ser posible controlar la plasticidad alterando la disponibilidad de adenosina (Blundon et al., 2017; Chun et al., 2013) y, por lo tanto, la adenosina podría ser un objetivo interesante para mejorar la salud, el aprendizaje y la memoria.

De manera similar a lo que se encontró en el hipocampo, la adenosina no es el único gliotransmisor necesario para la inducción de la t-LTP, sino que ATP/adenosina y glutamato son necesarios para mediar en la inducción de la t-LTP. Ya se sabe que los astrocitos individuales pueden liberar tanto adenosina como glutamato (Covelo y Araque, 2018), y de esta manera pueden controlar la actividad sináptica basal (Falcón-Moya et al., 2020; Panatier et al., 2011) y deprimir la neurotransmisión tónicamente (Pascual et al., 2005), probablemente deprimiendo algunas sinapsis y potenciando otras (Covelo y Araque, 2018).

Además, es posible que el glutamato de la neurona presináptica también active los NMDARs presinápticos, pero que esta cantidad de activación de glutamato o NMDARs sea insuficiente para inducir la t-LTP y que el glutamato liberado por los astrocitos también sea necesario para la t-LTP. Será interesante explorar cuál es el papel exacto de la neurona postsináptica en la inducción de la t-LTP y el papel de los mGluR1s. En cuanto al hipocampo, se necesita más investigación para abordar esta cuestión, pero el NO sintetizado por la neurona postsináptica parece liberarse y entrar en el astrocito, posiblemente estimulando la liberación de gliotransmisores al aumentar el flujo de calcio en el astrocito (Matyash et al., 2001).

En la actualidad, no está claro cuál es la función de estos cambios progresivos en la plasticidad durante el desarrollo que parecen estar controlados principalmente por la cantidad de adenosina liberada por los astrocitos en diferentes etapas del neurodesarrollo. De hecho, serán

necesarios más estudios para determinar la verdadera influencia de la STDP en la corteza de barriles y el papel de desarrollo específico de la t-LTD y t-LTP en estos circuitos. Como se ha discutido previamente (Pérez-Rodríguez et al., 2019; Falcón-Moya et al., 2020), lo más probable es que participe en el refinamiento de las sinapsis, debilitando potencialmente las sinapsis excitadoras que están infrautilizadas o son irrelevantes desde el punto de vista del comportamiento (Buonomano y Merzenich, 1998; Feldman y Brecht, 2005). La forma de t-LTP presináptica descrita aquí está presente desde la sexta semana de desarrollo, lo que indica su relevancia desde la edad adulta temprana en adelante, cuando probablemente influye en el aprendizaje y la memoria u otros procesos cognitivos, aunque también podría participar en el refinamiento sináptico a edades más tardías.

La plasticidad presináptica también puede implicar cambios estructurales y puede cambiar las propiedades de corta duración de la liberación de neurotransmisores, participar en las propiedades computacionales del circuito y cambiar el equilibrio excitador/inhibidor o las adaptaciones sensoriales (Monday et al., 2018). Responder a por qué algunas sinapsis, como la sinapsis L4-L2/3 (y como se observa en el hipocampo), muestran plasticidad presináptica y/o postsináptica requiere más estudio. Por ejemplo, la STDP de las sinapsis L4-L2/3 y L2/3-L2/3 en la corteza somatosensorial presenta diferentes requisitos, lo que indica que la expresión presináptica o postsináptica de la plasticidad es fundamental para el correcto funcionamiento de los circuitos cerebrales y que es posible que se regulen de manera diferente (Banerjee et al., 2009; Banerjee et al., 2014). Además, y como lo indican algunos modelos computacionales (Costa et al., 2017), la t-LTP expresada presinápticamente puede aumentar la confiabilidad de prueba a prueba, y junto con la t-LTP expresada postsinápticamente, puede inducir un cambio mayor en la relación señal-ruido que los cambios postsinápticos solos, como se describe en la corteza auditiva (Froemke et al., 2013). También, los diferentes sitios de expresión pueden ser una ventaja para el sistema, ya que puede ofrecer más posibilidades de plasticidad cuando uno está dañado.

Finalmente, puede ser posible asociar comportamientos concretos con un locus particular de plasticidad. La influencia conductual potencial de la LTP presináptica sigue siendo un tema emergente para el cual los datos disponibles provienen de las sinapsis MF-CA3 del hipocampo, donde esta LTP está implicada en el aprendizaje y la memoria (Hagena et al., 2011), y de las

sinapsis de la amígdala, donde la LTP presináptica está implicada en la formación de la memoria del miedo (Tovote et al., 2015).

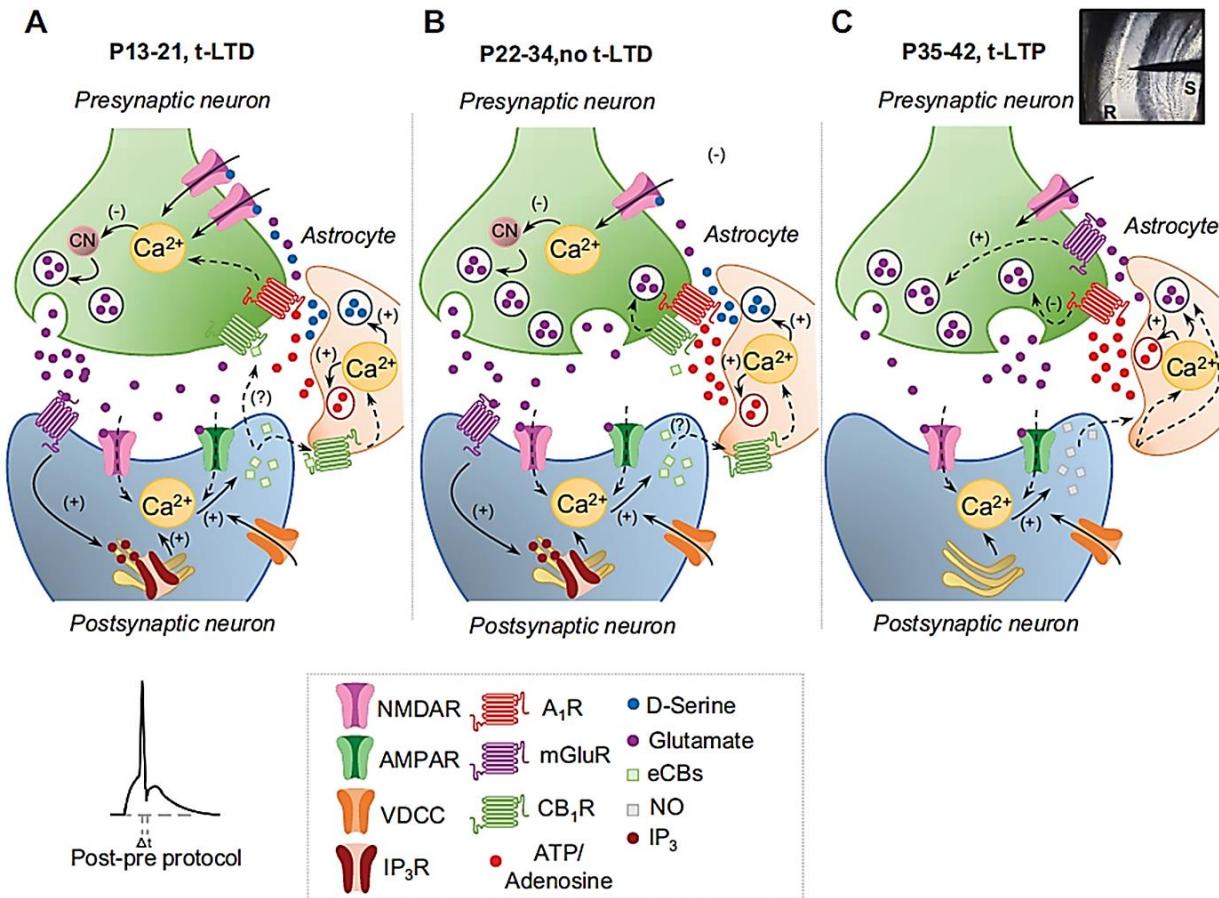


Figura 46. Esquema que muestra la señalización en las etapas de desarrollo temprano (P13–27), juvenil (P28–37) y adulta (P38–60) en la sinapsis L4–L2/3. (A) A P13-27, se induce una forma presináptica de t-LTD mediante un protocolo *post-pre*. Los potenciales de acción postsinápticos activan los VDCC, y el glutamato liberado presinápticamente activa los mGluRs postsinápticos, provocando la liberación de Ca²⁺ de las reservas internas y la síntesis de eCBs. Para la t-LTD, se necesita una señal de eCB para activar los receptores CB1 y facilitar la liberación de glutamato de los astrocitos. Con el glutamato liberado de las neuronas presinápticas, se sabe que este glutamato activa los NMDARs presinápticos en los terminales L4, lo que lleva a un aumento de los niveles intracelulares de Ca²⁺ y depresión sináptica. (B) A P28-37, la t-LTD no se observa, y la principal diferencia con respecto a P13-27 es un aumento en la liberación de adenosina por los astrocitos. (C) A P38-60, la t-LTD cambia a una forma presináptica de t-LTP. Aquí, los potenciales de acción postsinápticos activan los VDCC, provocando la liberación de Ca²⁺ de las reservas internas e induciendo la síntesis de NO. La señal de NO conduce a la activación de los astrocitos para liberar glutamato y/o adenosina para activar NMDARs y A₁Rs, respectivamente, en los terminales L4. La activación de A₁Rs reduce considerablemente la probabilidad de liberación de glutamato, mientras que la activación de NMDARs conduce a un aumento duradero en la liberación de glutamato y la potenciación sináptica. Tomado de Martínez-Gallego y Rodríguez-Moreno, 2022. A₁R = receptor de adenosina tipo 1; AMPAR = receptor de ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; CB₁R = receptor cannabinoido tipo 1; eCB = endocannabinoido; mGluR = receptor de glutamato metabotrópico; NMDAR = receptor de N-metil-d-aspartato; NO = óxido nítrico; P = día posnatal; t-LTD = depresión de larga duración dependiente del tiempo; t-LTP = potenciación de larga duración dependiente del tiempo; VDCC = canal de Ca²⁺ dependiente del voltaje.

Capítulo II: *Corteza entorrinal y giro dentado.*

CORTEZA ENTORRINAL Y GIRO DENTADO.

1. Se induce t-LTD en las sinapsis establecidas entre L2, L4 de la EC y las células granulares del DG.

Se ha observado que la t-LTD puede inducirse en ratones jóvenes en las sinapsis establecidas entre L4, L2 de la corteza entorinal y las células granulares del giro dentado (LPP-GC y MPP-GC), pareando la actividad presináptica con un potencial de acción postsináptico ($\Delta t = -18$ ms) y a una frecuencia de estimulación basal de 0.2 Hz, como ya se ha observado en otras sinapsis del hipocampo como Schaffer collaterals (SC)-CA1 (Andrade-Talavera et al., 2016; Falcón-Moya et al., 2020) o de la corteza (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008).

Para determinar el locus de expresión de esta forma de t-LTD se utilizaron dos aproximaciones diferentes, el análisis del coeficiente de variación y el análisis de la PPR. Se observaron cambios significativos en la PPR y en la gráfica del CV² los datos se sitúan por debajo de la diagonal, sugiriendo consistentemente que la expresión de esta forma de t-LTD es presináptica, como la descrita en SC-CA1 (Andrade-Talavera et al., 2016). Se sabe que las proyecciones de la corteza entorinal hacen sinapsis glutamatérgicas con células granulares del giro dentado, pero con diferentes propiedades funcionales dependiendo de si los aferentes provienen de la LPP o de la MPP. Por ejemplo, la sinapsis MPP-GC muestra una mayor probabilidad de liberación presináptica que la sinapsis LPP-GC (Savtchouk et al., 2019).

En futuros experimentos, será necesario estudiar otros intervalos temporales entre la actividad presináptica y la postsináptica (además de -18 ms) y, de esta forma, determinar si es más importante hablar de ventanas de plasticidad o del período del desarrollo en el que se intenta inducir la depresión, del protocolo de plasticidad seleccionado o si ambos enfoques deben ser tenidos en cuenta por igual.

2. La t-LTD desaparece al final de la tercera semana del desarrollo postnatal en la sinapsis MPP-GC, pero continúa presente en la sinapsis LPP-GC.

La t-LTD observada es diferente para las sinapsis MPP-GC y LPP-GC, requiriendo de mecanismos distintos para su inducción en cada una. Además, el perfil de desarrollo tampoco es idéntico. La t-LTD en la sinapsis MPP-GC desaparece muy temprano, en animales a partir de P22, como ya se ha descrito en SC-CA1 (Pérez-Rodríguez et al., 2019; Falcón-Moya et al., 2020), mientras que en la sinapsis LPP-GC continúa presente. La pérdida de la t-LTD en la sinapsis MPP-GC confirma los resultados de los estudios que muestran que la capacidad de inducir depresión sináptica va disminuyendo con el desarrollo (Corlew et al., 2007; Rodríguez-Moreno et al., 2013; Falcón-Moya et al., 2020). Faltaría por determinar cuándo desaparece la t-LTD en la sinapsis LPP-GC y si hay alguna función que explique por qué no se observa un patrón de desarrollo de la plasticidad similar en ambas rutas. Es decir, sería relevante caracterizar las ventanas de plasticidad en las dos sinapsis y determinar qué implicaciones funcionales podría tener el que tengan distintos perfiles de desarrollo.

En el futuro habría que investigar si en algún momento del neurodesarrollo se produce un cambio de t-LTD a t-LTP (aplicando un protocolo que normalmente induce t-LTD en animales jóvenes) como ya se ha observado en otras sinapsis caracterizadas por este mismo grupo como SC-CA1 (P35-42) (Falcón-Moya et al., 2020) o L4-L2/3 (Martínez-Gallego et al., 2022). De esta forma, si se extiende la pérdida de la t-LTD que se ha observado en otras regiones del cerebro - como la corteza visual, el hipocampo y recientemente la corteza somatosensorial- a la corteza entorrinal y el giro dentado, esto aportaría información para seguir investigando si se pudiera tratar de un evento que ocurre de forma general en el cerebro y posteriormente determinar cuál es su función.

3. La t-LTD requiere de receptores de tipo NMDA en la sinapsis MPP-GC, no siendo así para la sinapsis LPP-GC.

Se ha demostrado que la t-LTD requiere de NMDARs en la sinapsis MPP-GC (Figura 47B), ya que dicha t-LTD fue prevenida por la inclusión de D-AP5 (50 μ M), antagonista de receptores de tipo NMDA, en la solución extracelular. De manera similar a la sinapsis cortical establecida en L4-L2/3 de la corteza somatosensorial, los NMDARs postsinápticos no son necesarios para la t-LTD. La introducción de MK-801 (500 μ M) en la célula postsináptica no impidió la inducción de la t-LTD, lo que indica que los NMDARs podrían estar localizados en los terminales presinápticos. Es importante destacar que la aplicación extracelular de MK-801 bloqueó la inducción de la t-LTD, demostrando así que la función de los receptores ionotrópicos de NMDA no postsinápticos es necesaria para inducir t-LTD (Andrade-Talavera et al., 2016).

Probablemente, la activación de los preNMDARs en la sinapsis MPP-GC se deba a que estén tónicamente activos durante el neurodesarrollo, como se ha visto en otras sinapsis: corteza somatosensorial (Brasier y Feldman, 2008), visual (Corlew et al., 2007), hipocampo (Prius-Mengual et al., 2019) e incluso en la propia corteza entorrinal, en concreto en la L2 (Berretta y Jones, 1996). Tanto esta activación tónica como la modulación de la liberación de glutamato se pierden a medida que avanza el neurodesarrollo, indicando una reducción en la probabilidad de liberación.

Sin embargo, los NMDARs no parecen estar involucrados en la inducción de la t-LTD en la sinapsis LPP-GC, pues la inclusión de D-AP5 (50 μ M) en el baño no previno la inducción de la t-LTD, como tampoco lo hizo añadir MK-801 (500 μ M). Un trabajo reciente investigó las propiedades de los NMDARs presinápticos en las conexiones excitadoras entre los aferentes que pasan a través de la vía perforante y las células granulares del giro dentado, descubriendo que los NMDARs, que contienen GluN3A en las sinapsis PP-DG, son predominantemente presinápticos frente a postsinápticos y persisten más allá del período de desarrollo. Además, estos receptores se expresan selectivamente en la ruta medial, no lateral, y aumentan la probabilidad de liberación de la MPP en respuesta a los gliotransmisores liberados por los astrocitos (Savtchouk et al., 2019).

En cuanto a las subunidades que componen el receptor de NMDA en la sinapsis MPP-GC, un trabajo previo encontró que al estimular por separado la vía medial y lateral, la adición del

antagonista selectivo de GluN2B (Ifenprodil) disminuyó la amplitud de las eEPSC de las células granulares y aumentó la PPR en la sinapsis MPP-GC (pero no LPP-GC), lo que sugería que el receptor de NMDA estaría conformado por la subunidad GluN2B (Pérez-Otaño y Rodríguez-Moreno, 2019) y no GluN2A. Sin embargo, en los resultados del trabajo que se presenta en esta memoria, la t-LTD en MPP-GC no fue impedida por el antagonista selectivo de la subunidad GluN2B Ro 256981 (0.5 μ M). Este experimento se repitió en presencia de ifenprodil (10 μ M) -otro inhibidor de receptores que contienen la subunidad GluN2B- y, de nuevo, la t-LTD no se previno. Sí se bloqueó al añadir Zn²⁺ (300 nM) a la solución extracelular, indicando que son receptores de NMDA que contienen la subunidad GluN2A y no la GluN2B los que están involucrados en este tipo de t-LTD en la sinapsis MPP-GC.

4. La t-LTD requiere de mGluRs y de señalización endocannabinoide tanto en la sinapsis MPP-GC como en la sinapsis LPP-GC.

Según los resultados obtenidos, la t-LTD en la vía perforante requiere de mGluRs y de señalización endocannabinoide (Figura 47A, B), pues su inducción fue prevenida por la introducción en la solución extracelular de antagonistas de mGluRs y por la presencia de THL (5 μ M) en la neurona postsináptica. THL es un inhibidor de la enzima diacylglycerol lipasa, la cual está involucrada en la síntesis de eCBs. Por lo tanto, en la neurona postsináptica se produce la síntesis de eCBs que se liberan al medio extracelular y actúan sobre receptores CB₁, si bien aún no se sabe dónde están localizados estos receptores y serán necesarios experimentos adicionales para determinar si podría encontrarse en los astrocitos como se ha sugerido para el hipocampo (Andrade-Talavera et al., 2016).

Otros trabajos recientes han encontrado formas de LTD en estas mismas sinapsis que también requieren de mGluRs, como una LTD dependiente del receptor de cannabinoide tipo 1 (CB₁). El sistema endocannabinoide modula la plasticidad sináptica en el hipocampo, pero el vínculo entre esta plasticidad sináptica de larga duración y el receptor de cannabinoide tipo 1 (CB₁) en las sinapsis de la vía perforante no es tan evidente. No obstante, en los últimos años se han descrito algunos trabajos que relacionan formas de LTD en la sinapsis MPP-GC con el receptor CB₁. En concreto, la estimulación de MPP-GC con un protocolo de 10 Hz durante 10 min

desencadenó una depresión excitadora de larga duración dependiente del receptor CB₁ (eCB-eLTD) en la sinapsis MPP-GC de ratones control o *wild-type*, pero no en ratones *knock-out* para CB₁R (Peñasco et al., 2019). Del mismo modo, la estimulación de la MPP con un protocolo de 1 Hz y 900 pulsos también indujo LTD (Fontaine et al., 2020). Estas LTDs requerían de mGluRs del grupo I, como la t-LTD caracterizada en esta memoria.

Los NMDARs no parecen estar involucrados en la inducción de la t-LTD en la sinapsis LPP-GC y podrían ser los mGluRs los responsables de esta forma de plasticidad. Los experimentos realizados introduciendo GDPβS (1 mM) en la célula postsináptica sugieren que los mGluRs implicados en la t-LTD podrían ser presinápticos, ya que no se previno su inducción en ninguna de las sinapsis estudiadas. Se han descrito mGluRs presinápticos que modulan la liberación de glutamato en el hipocampo (Andrade-Talavera et al., 2016) y participan en la plasticidad (Gómez-Gonzalo et al. 2015). No obstante, también se ha informado de la existencia de mGluRs gliales (Porter y McCarthy 1996; Perea y Araque 2005) que también podrían tener un papel en esta forma de t-LTD, por lo que sería necesario realizar más experimentos para determinar la posible presencia o no de los mGluRs en los astrocitos.

5. La t-LTD requiere de señalización astrocitaria en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC.

Se ha demostrado la participación de los astrocitos en la t-LTD, ya que su inducción fue prevenida tras la inclusión de BAPTA en los astrocitos. Del mismo modo, en rodajas de ratones dn-SNARE, donde la liberación vesicular se encuentra eliminada, tampoco se pudo observar t-LTD. Se ha descrito previamente que los astrocitos participan en la t-LTD en otras regiones cerebrales como el hipocampo (Andrade-Talavera et al., 2016) o la corteza (Min y Nevian, 2012; Rodríguez-Moreno et al., 2013).

Se sabe que los astrocitos pueden liberar tanto ATP/adenosina como glutamato (Covelo y Araque, 2018) y controlar así la actividad sináptica. Los experimentos realizados aplicando “puffs” de glutamato (100 μM) en células de rodajas de ratones dn-SNARE, consiguieron recuperar la t-LTD. Este resultado indica que uno de los gliotransmisores que los astrocitos están

liberando es glutamato (Figura 47A, B). Sería interesante estudiar si ocurre como en otras sinapsis donde el perfil de desarrollo de la t-LTD está caracterizado y, además de glutamato, los astrocitos liberan otros gliotransmisores como ATP/adenosina (Martínez-Gallego et al., 2022) o D-Serina (Andrade-Talavera et al., 2016) y determinar si están implicados en el cierre de las ventanas de plasticidad en las sinapsis PP-GC, así como si pueden volver a abrirse. Por ejemplo, el papel de la adenosina en el cierre de ventanas de plasticidad está postulándose para ser considerado un evento regulatorio común, pues se ha observado ya en la corteza auditiva adulta (Blundon et al., 2017), el hipocampo (Pérez-Rodríguez et al., 2019) y la corteza somatosensorial primaria (Martínez-Gallego et al., 2022).

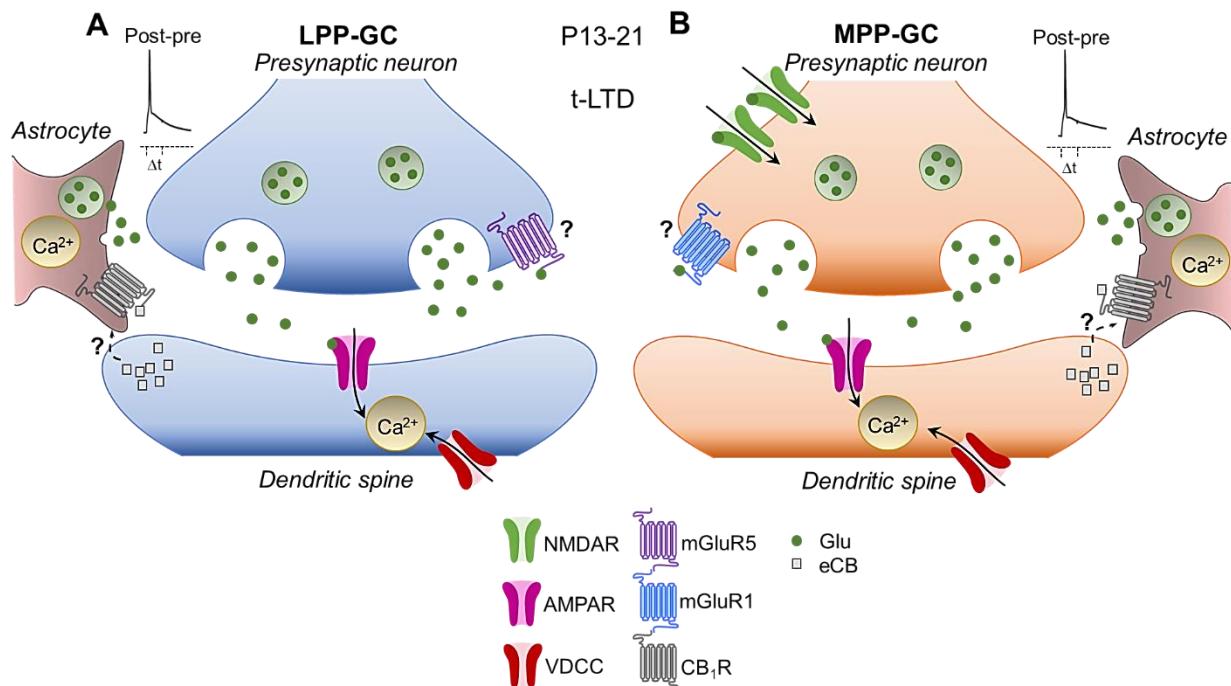


Figura 47. Esquema que muestra la señalización a P13–21 en las sinapsis establecidas entre la corteza entorrinal y el giro dentado (LPP-GC y MPP-GC). En ambas vías se induce una forma presináptica de t-LTD mediante un protocolo *post-pre*, que en LPP-GC (**A**) es independiente de NMDARs, siendo los mGluRs (en concreto, mGluR5) los responsables, y en MPP-GC (**B**) están involucrados los NMDARs presinápticos y también los mGluRs (mGluR1). En la neurona postsináptica se produce la síntesis de eCBs, cuyo receptor aún no se sabe dónde está localizado, aunque podría encontrarse en los astrocitos. AMPAR: receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; CB₁R: receptor cannabinoido tipo 1; eCB: endocannabinoide; mGluR: receptor metabotrópico de glutamato; NMDAR: receptor de N-metil-d-aspartato; VDCC: canal de Ca²⁺ dependiente del voltaje.

6. Importancia fisiológica de la *spike timing-dependent plasticity* en las sinapsis establecidas entre L2, L4 de EC y las células granulares del DG de hipocampo de ratón.

Como se ha descrito para el hipocampo (Falcón Moya et al., 2020) y la corteza somatosensorial (Martínez-Gallego et al., 2022), es probable que la t-LTD participe en el refinamiento de las conexiones sinápticas y, por tanto, tenga un papel relevante en el establecimiento de circuitos sinápticos responsables de una adecuada fisiología en la etapa adulta. Algunos estudios recientes están comenzando a explorar cómo la plasticidad contribuye al desarrollo de los circuitos neuronales y juega un papel determinante en los períodos críticos a lo largo del desarrollo cerebral (Jenks et al., 2021); y cada vez se refuerza más la idea de una posible función de la t-LTD en procesos de poda sináptica (Buonomano y Merzenich, 1998; Feldman y Brecht, 2005), donde se debilitan o eliminan aquellas conexiones sinápticas que no resultan eficientes, están en desuso o son irrelevantes, a la vez que se establecen nuevas y se refuerzan las que son útiles.

Sin embargo, hasta la fecha no se sabe con exactitud cuál es la función fisiológica de la t-LTD durante el desarrollo postnatal y en adultos. Caracterizar la t-LTD en las sinapsis establecidas entre L2, L4 de EC y las células granulares del giro dentado de hipocampo resulta especialmente interesante ya que, como se ha descrito previamente en esta memoria, desde la EC se envían dos tipos de proyecciones al hipocampo que transmiten información de diferente naturaleza. Esto sugiere que la MPP y la LPP procesan distintas clases de información, a pesar de establecer sinapsis con el mismo tipo de célula granular. Por lo tanto, una línea de investigación futura podría ser estudiar la relación entre ventanas de plasticidad, t-LTD y comportamiento en las sinapsis L2, L4 de EC-DG, y determinar si MPP y LPP participan en distintos procesos comportamentales y formas de aprendizaje y memoria. La sinapsis MPP-GC se ha relacionado con aprendizaje espacial mientras que la sinapsis LPP-GC estaría más implicada en el reconocimiento de objetos o de sus características definitorias.

Por otro lado, resultaría interesante incluir en el estudio modelos animales de la Enfermedad de Alzheimer, ya que la corteza entorrinal parece ser una de las primeras regiones del cerebro afectadas por la enfermedad y lesiones en esta región se han vinculado con algunos de sus síntomas principales como la dificultad para almacenar información nueva, para reconocer las propiedades de un estímulo con el que se estaba familiarizado o la desorientación espaciotemporal.

VI. Conclusiones

CONCLUSIONES.

1. Un tipo de t-LTD presináptica está presente en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial primaria a P13-27.
2. Esta forma de t-LTD en la sinapsis L4/L2/3 de la corteza somatosensorial desaparece a P28-37.
3. La pérdida de t-LTD durante el neurodesarrollo en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial no se debe a un cambio en el intervalo temporal entre estímulos presinápticos y postsinápticos.
4. La pérdida de la t-LTD durante el desarrollo cerebral en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial implica un incremento de la inhibición mediada por la activación de receptores presinápticos de adenosina de tipo 1 (A₁).
5. La pérdida de la t-LTD presináptica durante el neurodesarrollo en la sinapsis L4-L2/3 de corteza somatosensorial requiere de un aumento de la liberación de ATP/adenosina por parte de los astrocitos.
6. El protocolo que induce t-LTD en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial a P13-27 induce una t-LTP presináptica a P38-60.
7. La t-LTP presináptica presente en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial requiere de NMDARs y de mGluRs.
8. La t-LTP presináptica presente en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial requiere de la participación de los astrocitos, que liberan glutamato y adenosina.
9. La t-LTP presináptica presente en la sinapsis L4-L2/3 de la corteza somatosensorial requiere de señalización mediada por NO.
10. Un tipo de t-LTD presináptica está presente en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC a P13-21, siguiendo presente en la sinapsis LPP-GC y desapareciendo en la sinapsis MPP-GC a P22-28.

11. La t-LTD requiere de NMDARs y mGluR1 en la sinapsis MPP-GC, pero en la sinapsis LPP-GC es independiente de NMDARs y requiere de mGluR5.
12. La t-LTD en las sinapsis LPP-GC y MPP-GC requiere de señalización endocannabinoide y astrocitaria.

CONCLUSIONS.

1. A form of presynaptic t-LTD is present during P13-27 at the L4-L2/3 synapse of the somatosensory cortex.
2. This form of t-LTD disappears during P28-37 at the L4-L2/3 synapse of the somatosensory cortex.
3. The loss of t-LTD at the L4-L2/3 synapse of the somatosensory cortex does not depend on the time window between pre and postsynaptic stimuli.
4. The loss of the t-LTD during development at the L4-L2/3 synapse of the somatosensory cortex involves an increase in the inhibition mediated by the activation of presynaptic type 1 adenosine receptors.
5. The loss of t-LTD at the L4-L2/3 synapse of the somatosensory cortex requires an increase of adenosine release from astrocytes.
6. The protocol that induces t-LTD during P13-21 induces t-LTP during P38-60 at the L4-L2/3 synapse of the somatosensory cortex.
7. The t-LTP that is present at the L4-L2/3 synapse of the somatosensory cortex requires NMDARs and mGluRs.
8. The t-LTP that is present at the L4-L2/3 synapse of the somatosensory cortex requires astrocytes releasing glutamate and adenosine.
9. The t-LTP that is present at the L4-L2/3 synapse of the somatosensory cortex requires NO mediated signaling.
10. This form of presynaptic t-LTD is present at the LPP-GC and MPP-GC synapses at P13-21, is still present during P22-28 at the LPP-GC synapse and disappearing at the MPP-GC synapse.

11. This form of t-LTD requires NMDARs and mGluR1 at the MPP-GC synapse, but at the LPP-GC synapse it is independent of NMDARs and requires mGluR5.
12. This form of t-LTD at LPP-GC and MPP-GC synapses requires endocannabinoid and astrocyte signaling.

VII. Referencias

REFERENCIAS.

- Abraham, W. C. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 9(5), 387. doi:10.1038/nrn2356
- Agmon, A., & Connors, B. W. (1991). Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience*, 41(2-3), 365-379. doi:10.1016/0306-4522(91)90333-j
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Paulsen, O., & Rodríguez-Moreno, A. (2016). Presynaptic Spike Timing-Dependent Long-Term Depression in the Mouse Hippocampus. *Cereb Cortex*, 26(8), 3637-3654. doi:10.1093/cercor/bhw172
- Anwyl, R. (2009). Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology*, 56(4), 735-740. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.01.002
- Arai, A., Kessler, M., & Lynch, G. (1990). The effects of adenosine on the development of long-term potentiation. *Neuroscience Letters*, 119(1), 41-44. doi:10.1016/0304-3940(90)90750-4
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H., Robitaille, R., & Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, 81(4), 728-739. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.007
- Araque, A., Li, N., Doyle, R. T., & Haydon, P. G. (2000). SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*, 20(2), 666-673. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-02-00666.2000
- Araque, A., & Navarrete, M. (2010). Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1551), 2375-2381. doi:10.1098/rstb.2009.0313
- Banerjee, A., González-Rueda, A., Sampaio-Baptista, C., Paulsen, O., & Rodríguez-Moreno, A. (2014). Distinct mechanisms of spike timing-dependent LTD at vertical and horizontal inputs onto L2/3 pyramidal neurons in mouse barrel cortex. *Physiol Rep*, 2(3), e00271. doi:10.1002/phy2.271

- Banerjee, A., Meredith, R. M., Rodríguez-Moreno, A., Mierau, S. B., Auberson, Y. P., & Paulsen, O. (2009). Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunit-preferring NMDA receptor antagonists in mouse barrel cortex. *Cereb Cortex*, 19(12), 2959-2969. doi:10.1093/cercor/bhp067
- Banks, M. I., Hardie, J. B., & Pearce, R. A. (2002). Development of GABA(A) receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in hippocampus. *J Neurophysiol*, 88(6), 3097-3107. doi:10.1152/jn.00026.2002
- Bear, M. F., & Abraham, W. C. (1996). Long-term depression in hippocampus. *Annu Rev Neurosci*, 19, 437-462. doi:10.1146/annurev.ne.19.030196.002253
- Bear, M. F., & Malenka, R. C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol*, 4(3), 389-399. doi:10.1016/0959-4388(94)90101-5
- Behr, J., Wozny, C., Fidzinski, P., & Schmitz, D. (2009). Synaptic plasticity in the subiculum. *Prog Neurobiol*, 89(4), 334-342. doi:10.1016/j.pneurobio.2009.09.002
- Bender, V. A., Bender, K. J., Brasier, D. J., & Feldman, D. E. (2006). Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J Neurosci*, 26(16), 4166-4177. doi:10.1523/JNEUROSCI.0176-06.2006
- Berretta, N., & Jones, R. S. (1996). Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the entorhinal cortex. *Neuroscience*, 75(2), 339-344. doi:10.1016/0306-4522(96)00301-6
- Bidoret, C., Ayon, A., Barbour, B., & Casado, M. (2009). Presynaptic NR2A-containing NMDA receptors implement a high-pass filter synaptic plasticity rule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33), 14126-14131. doi:10.1073/pnas.0904284106
- Blackman, A. V., Abrahamsson, T., Costa, R. P., Lalanne, T., & Sjöström, P. J. (2013). Target-cell-specific short-term plasticity in local circuits. *Front Synaptic Neurosci*, 5: 11. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2013.00011>
- Bliss, T., & Collingridge, G. L. (2019). Persistent memories of long-term potentiation and the N-methyl-d-aspartate receptor. *Brain Neurosci Adv*, 3, 2398212819848213. doi:10.1177/2398212819848213

- Bliss, T. V., Collingridge, G. L., & Morris, R. G. (2014). Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1633), 20130129. doi:10.1098/rstb.2013.0129
- Bliss, T. V., & Cooke, S. F. (2011). Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics (Sao Paulo)*, 66 Suppl 1(Suppl 1), 3-17. doi:10.1590/s1807-59322011001300002
- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232(2), 331-356. doi:10.1113/jphysiol.1973.sp010273
- Blitz, D. M., Foster, K. A., & Regehr, W. G. (2004). Short-term synaptic plasticity: a comparison of two synapses. *Nat Rev Neurosci*, 5(8), 630-640. doi:10.1038/nrn1475
- Blundon, J. A., Roy, N. C., Teubner, B. J. W., Yu, J., Eom, T. Y., Sample, K. J., . . . Zakharenko, S. S. (2017). Restoring auditory cortex plasticity in adult mice by restricting thalamic adenosine signaling. *Science*, 356(6345), 1352-1356. doi:10.1126/science.aaf4612
- Bonansco, C., Couve, A., Perea, G., Ferradas, C.A., Roncagliolo, M., & Fuenzalida, M. (2011). Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* 33, 1483-1492. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07631.x
- Branco, T., & Staras, K. (2009). The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nat Rev Neurosci*, 10(5), 373-383. doi:10.1038/nrn2634
- Brasier, D. J., & Feldman, D. E. (2008). Synapse-specific expression of functional presynaptic NMDA receptors in rat somatosensory cortex. *J Neurosci*, 28(9), 2199-2211. doi:10.1523/JNEUROSCI.3915-07.2008
- Brock, J. A., Thomazeau, A., Watanabe, A., Li, S. S. Y., & Sjöström, P. J. (2020). A Practical Guide to Using CV Analysis for Determining the Locus of Synaptic Plasticity. *Front Synaptic Neurosci*, 12, 11. doi:10.3389/fnsyn.2020.00011

Brzosko, Z., Mierau, S. B., & Paulsen, O. (2019). Neuromodulation of Spike-Timing-Dependent Plasticity: Past, Present, and Future. *Neuron*, 103(4), 563-581. doi:10.1016/j.neuron.2019.05.041

Buonomano, D. V., & Merzenich, M. M. (1998). Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu Rev Neurosci*, 21, 149-186. doi:10.1146/annurev.neuro.21.1.149

Bureau, I., Von Saint Paul, F. & Svoboda, K. (2006). Interdigitated paralemniscal and lemniscal pathways in the mouse barrel cortex. *PLoS Biol*, 4,382. doi: 10.1371/journal.pbio.0040382

Castillo, P. E. (2012). Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(2). doi:10.1101/cshperspect.a005728

Castro-Alamancos, M. A., & Calcagnotto, M. E. (1999). Presynaptic Long-Term Potentiation in Corticothalamic Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 19(20), 9090-9097. doi:10.1523/jneurosci.19-20-09090.1999

Charles, A. C., Merrill, J. E, Dirksen, E.R., & Sanderson, M.J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*, 6(6): 983-92. doi: 10.1016/0896-6273(91)90238-u

Cheetham, C. E., & Fox, K. (2010). Presynaptic development at L4 to I2/3 excitatory synapses follows different time courses in visual and somatosensory cortex. *J Neurosci*, 30(38), 12566-12571. doi:10.1523/JNEUROSCI.2544-10.2010

Chen, B. S., & Roche, K. W. (2009). Growth factor-dependent trafficking of cerebellar NMDA receptors via protein kinase B/Akt phosphorylation of NR2C. *Neuron*, 62(4), 471-478. doi:10.1016/j.neuron.2009.04.015

Chen, H. X., Jiang, M., Akakin, D., & Roper, S. N. (2009). Long-term potentiation of excitatory synapses on neocortical somatostatin-expressing interneurons. *J Neurophysiol*, 102(6), 3251-3259. doi:10.1152/jn.00641.2009

Chen, Q. Y., Li, X. H., Lu, J. S., Liu, Y., Lee, J. A., Chen, Y. X., Shi, W., Fan, K., & Zhuo, M. (2021). NMDA GluN2C/2D receptors contribute to synaptic regulation and plasticity in the anterior cingulate cortex of adult mice. *Mol Brain*, 14(1), 60. doi:10.1186/s13041-021-00744-3

- Chevaleyre, V., Takahashi, K. A., & Castillo, P. E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, 29, 37-76. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112834
- Chun, S., Bayazitov, I. T., Blundon, J. A., & Zakharenko, S. S. (2013). Thalamocortical long-term potentiation becomes gated after the early critical period in the auditory cortex. *J Neurosci*, 33(17), 7345-7357. doi:10.1523/JNEUROSCI.4500-12.2013
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18-41. doi:10.1038/sj.npp.1301559
- Colino, A., Muñoz-Cuevas, J., & Vara, H. (2002). Plasticidad sináptica a corto plazo. *Rev Neurol* 34(6), 593-599. doi: 10.33588/rn.3406.2002165
- Collitti-Klausnitzer, J., Hagen, H., Dubovyk, V., & Manahan-Vaughan, D. (2021). Preferential frequency-dependent induction of synaptic depression by the lateral perforant path and of synaptic potentiation by the medial perforant path inputs to the dentate gyrus. *Hippocampus*, 31(9), 957-981. doi:10.1002/hipo.23338
- Corlew, R., Wang, Y., Ghermazien, H., Erisir, A., & Philpot, B. D. (2007). Developmental switch in the contribution of presynaptic and postsynaptic NMDA receptors to long-term depression. *J Neurosci*, 27(37), 9835-9845. doi:10.1523/JNEUROSCI.5494-06.2007
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., & Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, 26; 247(4941): 470-3. doi: 10.1126/science.1967852
- Costa, R. P., Mizusaki, B. E., Sjöström, P. J., & van Rossum, M. C. (2017). Functional consequences of pre- and postsynaptic expression of synaptic plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 372(1715). doi:10.1098/rstb.2016.0153
- Covelo, A., & Araque, A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *eLife*, 7. doi:10.7554/eLife.32237
- Coyle, J. T. (2006). Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell Mol Neurobiol*, 26(4-6), 365-384. doi:10.1007/s10571-006-9062-8

- Cull-Candy, S. G., & Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE*, 2004(255), re16. doi:10.1126/stke.2552004re16
- Dan, Y., & Poo, M. M. (2001). Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron*, 32, 1149–1164
- De Carlos, J. A., & Borrell, J. (2007). A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience. *Brain Res Rev*, 55(1), 8-16. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.03.010
- De Mendonça, A., & Ribeiro, J. A. (1994). Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience*, 62(2), 385-390. doi:10.1016/0306-4522(94)90373-5
- DeFelipe, J. (2006). Brain plasticity and mental processes: Cajal again. *Nat Rev Neurosci*, 7(10), 811-817. doi:10.1038/nrn2005
- Di Castro, M. A., & Volterra, A. (2022). Astrocyte control of the entorhinal cortex-dentate gyrus circuit: Relevance to cognitive processing and impairment in pathology. *Glia*, 70(8), 1536-1553. doi:10.1002/glia.24128
- Dietrich, D., Beck, H., Kral, T., Clusmann, H., Elger, C. E., & Schramm, J. (1997). Metabotropic glutamate receptors modulate synaptic transmission in the perforant path: pharmacology and localization of two distinct receptors. *Brain Res*, 767(2), 220-227. doi:10.1016/s0006-8993(97)00579-9
- Dunwiddie, T. V., & Masino, S. A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 24, 31-55. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.31
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*, 24(3), 312-325. doi:10.1038/s41593-020-00783-4

- Falcón-Moya, R., Pérez-Rodríguez, M., Prius-Mengual, J., Andrade-Talavera, Y., Arroyo-García, L. E., Pérez-Artés, R., . . . Rodríguez-Moreno, A. (2020). Astrocyte-mediated switch in spike timing-dependent plasticity during hippocampal development. *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-020-18024-4
- Feldman, D. E. (2000). Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron*, 27(1), 45-56. doi:10.1016/s0896-6273(00)00008-8
- Feldman, D. E. (2012). The spike-timing dependence of plasticity. *Neuron*, 75(4), 556-571. doi:10.1016/j.neuron.2012.08.001
- Feldman, D. E., & Brecht, M. (2005). Map plasticity in somatosensory cortex. *Science*, 310(5749), 810-815. doi:10.1126/science.1115807
- Feldmeyer, D. (2012). Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front Neuroanat*, 6, 24. doi:10.3389/fnana.2012.00024
- Ferbinteanu, J., Holsinger, R. M., & McDonald, R. J. (1999). Lesions of the medial or lateral perforant path have different effects on hippocampal contributions to place learning and on fear conditioning to context. *Behav Brain Res*, 101(1), 65-84. doi:10.1016/s0166-4328(98)00144-2
- Finger, S., & Wade, N. J. (2002). The neuroscience of Helmholtz and the theories of Johannes Müller. Part 2: Sensation and perception. *J Hist Neurosci*, 11(3), 234-254. doi:10.1076/jhin.11.3.234.10392
- Flight, M. H. (2008). On the probability of release. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(10), 737-737. doi:10.1038/nrn2500
- Fontaine, C. J., Grafe, E. L., Pinar, C., Bonilla-Del Río, I., Grandes, P., & Christie, B. R. (2020). Endocannabinoid receptors contribute significantly to multiple forms of long-term depression in the rat dentate gyrus. *Learn Mem*, 27(9), 380-389. doi:10.1101/lm.050666.119
- Fox, K. (2002). Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience*, 111(4), 799-814. doi:10.1016/s0306-4522(02)00027-1

- Freeman, M. R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science*, 330(6005), 774-778. doi:10.1126/science.1190928
- Froemke, R. C., Carcea, I., Barker, A. J., Yuan, K., Seybold, B. A., Martins, A. R., . . . Schreiner, C. E. (2013). Long-term modification of cortical synapses improves sensory perception. *Nat Neurosci*, 16(1), 79-88. doi:10.1038/nn.3274
- Fujita, T., Chen, M. J., Li, B., Smith, N. A., Peng, W., Sun, W., Toner, M. J., Kress, B. T., Wang, L., Benraiss, A., Takano, T., Wang, S., & Nedergaard, M. (2014). Neuronal transgene expression in dominant-negative SNARE mice. *J Neurosci*, 34(50), 16594-16604. doi:10.1523/JNEUROSCI.2585-14.2014
- Gómez-Gonzalo, M., Navarrete, M., Perea, G., Covelo, A., Martín-Fernández, M., Shigemoto, R., Luján, R., & Araque, A. (2015). Endocannabinoids Induce Lateral Long-Term Potentiation of Transmitter Release by Stimulation of Gliotransmission. *Cereb Cortex*, 25(10), 3699-3712. doi:10.1093/cercor/bhu231
- González-Rueda, A., Pedrosa, V., Feord, R. C., Clopath, C., & Paulsen, O. (2018). Activity-Dependent Downscaling of Subthreshold Synaptic Inputs during Slow-Wave-Sleep-like Activity In Vivo. *Neuron*, 97(6), 1244-1252 e1245. doi:10.1016/j.neuron.2018.01.047
- Hagena, H., & Manahan-Vaughan, D. (2011). Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing. *Cereb Cortex*, 21(11), 2442-2449. doi:10.1093/cercor/bhq271
- Haidarliu, S., Yu, C., Rubin, N., & Ahissar, E. (2008). Lemniscal and Extralemniscal Compartments in the VPM of the Rat. *Front Neuroanat*, 2, 4. doi:10.3389/neuro.05.004.2008
- Hargreaves, E. L., Rao, G., Lee, I., & Knierim, J. J. (2005). Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science*, 308(5729), 1792-1794. doi:10.1126/science.1110449
- Hebb, D.O. (1949). The organization of behavior. Wiley.

- Heidinger, V., Manzerra, P., Qing, X., Strasser, U., Yu, S. P., Choi, D. W., & Behrens, M. (2002). Metabotropic Glutamate Receptor 1-Induced Upregulation of NMDA Receptor Current: Mediation through the Pyk2/Src-Family Kinase Pathway in Cortical Neurons. *J Neurosci.*
- Hensch, T. K. (2004). Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci*, 27, 549-579. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144327
- Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*, 6(11), 877-888. doi:10.1038/nrn1787
- Hollman, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17, 31-108.
- Huckstepp, R. T., id Bihi, R., Eason, R., Spyer, K. M., Dicke, N., Willecke, K., Marina, N., Gourine, A. V., & Dale, N. (2010). Connexin hemichannel-mediated CO₂-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J Physiol*, 588(Pt 20), 3901-3920. doi:10.1113/jphysiol.2010.192088
- Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*, 80(3), 704-717. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.025
- Hunsaker, M. R., Mooy, G. G., Swift, J. S., & Kesner, R. P. (2007). Dissociations of the medial and lateral perforant path projections into dorsal DG, CA3, and CA1 for spatial and nonspatial (visual object) information processing. *Behav Neurosci*, 121(4), 742-750. doi:10.1037/0735-7044.121.4.742
- Inglebert, Y., Aljadeff, J., Brunel, N., & Debanne, D. (2020). Synaptic plasticity rules with physiological calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(52), 33639-33648. doi:10.1073/pnas.2013663117
- Jackman, S. L., & Regehr, W. G. (2017). The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron*, 94(3), 447-464. doi:10.1016/j.neuron.2017.02.047
- Jiang, N., Cupolillo, D., Grosjean, N., Muller, E., Deforges, S., Mulle, C., & Amedee, T. (2021). Impaired plasticity of intrinsic excitability in the dentate gyrus alters spike transfer in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 154, 105345. doi:10.1016/j.nbd.2021.105345

- Jo, Y. H., & Schlichter, R. (1999). Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci*, 2(3), 241-245. doi:10.1038/6344
- Jones, E. G. (1999). Colgi, Cajal and the Neuron Doctrine. *J Hist Neurosci*, 8(2), 170-178. doi:10.1076/jhin.8.2.170.1838
- Jourdain, P., Bergersen, L. H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gunderson, V., & Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci*, 10(3), 331-339. doi:10.1038/nn1849
- Kandel, E. R. T., L. (1964). Mechanism of prolonged heterosynaptic facilitation. *Nature*, 202, 145-147.
- Kauer, J. A., & Malenka, R. C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci*, 8(11), 844–858. <https://doi.org/10.1038/nrn2234>
- Kavalali, E. T. (2015). The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci*, 16(1), 5-16. doi:10.1038/nrn3875
- Kerr, M. I., Wall, M. J., & Richardson, M. J. (2013). Adenosine A1 receptor activation mediates the developmental shift at layer 5 pyramidal cell synapses and is a determinant of mature synaptic strength. *J Physiol*, 591(13), 3371-3380. doi:10.1113/jphysiol.2012.244392
- Klyuch, B. P., Dale, N., & Wall, M. J. (2012). Deletion of ecto-5'-nucleotidase (CD73) reveals direct action potential-dependent adenosine release. *J Neurosci*, 32(11), 3842-3847. doi:10.1523/JNEUROSCI.6052-11.2012
- Ladera, C., Godino M. C., Martín, R., Luján, R., Shigemoto, R., Ciruela, F., Torres, M., & Sánchez-Prieto, J. (2007). The coexistence of multiple receptors in a single nerve terminal provides evidence for pre-synaptic integration. *J Neurochem*, 103(6), 2314-2326. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04964.x
- Lau, C. G., & Zukin, R. S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 8(6), 413-426. doi:10.1038/nrn2153

- Lee, H. K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M. F., & Huganir, R. L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*, 405(6789), 955-959. doi:10.1038/35016089
- Li, D., Zavaglia, M., Wang, G., Xie, H., Hu, Y., Werner, R., Guan, J. S., & Hilgetag, C. C. (2019). Discrimination of the hierarchical structure of cortical layers in 2-photon microscopy data by combined unsupervised and supervised machine learning. *Sci Rep*, 9(1), 7424. doi: 10.1038/s41598-019-43432-y
- Lin, Y. W., Yang, H. W., Wang, H. J., Gong, C. L., Chiu, T. H., & Min, M. Y. (2006). Spike-timing-dependent plasticity at resting and conditioned lateral perforant path synapses on granule cells in the dentate gyrus: different roles of N-methyl-D-aspartate and group I metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci*, 23(9), 2362-2374. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04730.x
- Lisman, J. (1989). A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23), 9574-9578. doi:10.1073/pnas.86.23.9574
- Lopez-Rojas, J., Heine, M., & Kreutz, M. R. (2016). Plasticity of intrinsic excitability in mature granule cells of the dentate gyrus. *Sci Rep*, 6, 21615. doi:10.1038/srep21615
- López de Armentia, M., & Sah, P. (2007). Bidirectional synaptic plasticity at nociceptive afferents in the rat central amygdala. *J Physiol*, 581(3), 961-970. doi:10.1113/jphysiol.2006.121822
- Lovatt, D., Xu, Q., Liu, W., Takano, T., Smith, N. A., Schnermann, J., Tieu, K., & Nedergaard, M. (2012). Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(16), 6265-6270. doi:10.1073/pnas.1120997109
- Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 25, 103-126. doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758
- Malinow, R., & Tsien, R. W. (1990). Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature*, 346(6280), 177-180. doi:10.1038/346177a0

- Mameli, M., Carta, M., Partridge, L. D., & Valenzuela, C. F. (2005). Neurosteroid-induced plasticity of immature synapses via retrograde modulation of presynaptic NMDA receptors. *J Neurosci*, 25(9), 2285-2294. doi:10.1523/JNEUROSCI.3877-04.2005
- Manzoni, O., Prezeau, L., Sladeczek, F., & Bockaert, J. (1992). Trans-ACPD inhibits cAMP formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Eur J Pharmacol*, 225(4), 357-358. doi:10.1016/0922-4106(92)90112-9
- Manzoni, O. J., Manabe, T., & Nicoll, R. A. (1994). Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science*, 265(5181), 2098-2101. doi:10.1126/science.7916485
- Marcantoni, A., Raymond, E. F., Carbone, E., & Marie, H. (2014). Firing properties of entorhinal cortex neurons and early alterations in an Alzheimer's disease transgenic model. *Pflugers Arch*, 466(7), 1437-1450. doi:10.1007/s00424-013-1368-z
- Mares, P., Kozlova, L., Mikulecka, A., & Kubova, H. (2021). The GluN2B-Selective Antagonist Ro 25-6981 Is Effective against PTZ-Induced Seizures and Safe for Further Development in Infantile Rats. *Pharmaceutics*, 13(9). doi:10.3390/pharmaceutics13091482
- Markram, H., Gerstner, W., & Sjöström, P. J. (2011). A history of spike-timing-dependent plasticity. *Front Synaptic Neurosci*, 3, 4. doi:10.3389/fnsyn.2011.00004
- Martínez, L. R., Black, K. C., Webb, B. T., Bell, A., Baygani, S. K., Mier, T. J., Domínguez, L., Mackie, K., & Kalinovsky, A. (2020). Components of Endocannabinoid Signaling System Are Expressed in the Perinatal Mouse Cerebellum and Required for Its Normal Development. *eNeuro*, 7(2). doi:10.1523/ENEURO.0471-19.2020
- Martínez-Gallego, I., Pérez-Rodríguez, M., Coatl-Cuaya, H., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2022). Adenosine and astrocytes determine the developmental dynamics of spike timing-dependent plasticity in the somatosensory cortex. *J Neurosci*, 42(31), 6038–6052. doi:10.1523/JNEUROSCI.0115
- Mateos-Aparicio, P., & Rodríguez-Moreno, A. (2020). Calcium Dynamics and Synaptic Plasticity. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 965-984).

- Matyash, V., Filippov, V., Mohrhagen, K., & Kettenmann, H. (2001). Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice. *Mol Cell Neurosci*, 18(6), 664-670. doi:10.1006/mcne.2001.1047
- McGuinness, L., Taylor, C., Taylor, R. D., Yau, C., Langenhan, T., Hart, M. L., Christian, H., Tynan, P. W., Donnelly, P., & Emptage, N. J. (2010). Presynaptic NMDARs in the hippocampus facilitate transmitter release at theta frequency. *Neuron*, 68(6), 1109-1127. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.023
- Mederos, S., González-Arias, C., & Perea, G. (2018). Astrocyte-Neuron Networks: A Multilane Highway of Signaling for Homeostatic Brain Function. *Front Synaptic Neurosci*, 10, 45. doi:10.3389/fnsyn.2018.00045
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2022). *Atlas de Histología Vegetal y Animal*. In. Retrieved from <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.
- Meredith, R. M., Floyer-Lea, A. M., & Paulsen, O. (2003). Maturation of Long-Term Potentiation Induction Rules in Rodent Hippocampus: Role of GABAergic Inhibition. *The Journal of Neuroscience*, 23(35), 11142-11146. doi:10.1523/jneurosci.23-35-11142.2003
- Miller, R. H., & Raff, M. C. (1984). Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci*, 4(2), 585-592. doi:10.1523/JNEUROSCI.04-02-00585.1984
- Min, M. Y., Asztely, F., Kokaia, M., & Kullmann, D. M. (1998). Long-term potentiation and dual-component quantal signaling in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8), 4702-4707. doi:10.1073/pnas.95.8.4702
- Min, R., & Nevian, T. (2012). Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nat Neurosci*, 15(5), 746-753. doi:10.1038/nn.3075
- Monday, H. R., Younts, T. J., & Castillo, P. E. (2018). Long-Term Plasticity of Neurotransmitter Release: Emerging Mechanisms and Contributions to Brain Function and Disease. *Annu Rev Neurosci*, 41, 299-322. doi:10.1146/annurev-neuro-080317-062155

- Mony, L., Kew, J. N., Gunthorpe, M. J., & Paoletti, P. (2009). Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol*, 157(8), 1301-1317. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00304.x
- Moser, E. I., Moser, M. B., & McNaughton, B. L. (2017). Spatial representation in the hippocampal formation: a history. *Nat Neurosci*, 20(11), 1448-1464. doi:10.1038/nn.4653
- Navarrete, M., Díez, A., & Araque, A. (2014). Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1654), 20130599. doi:10.1098/rstb.2013.0599
- Nevian, T., & Sakmann, B. (2006). Spine Ca²⁺ signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci*, 26(43), 11001-11013. doi:10.1523/JNEUROSCI.1749-06.2006
- Nicoll, R. A., & Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci*, 6(11), 863-876. doi:10.1038/nrn1786
- Padamsey, Z., & Emptage, N. (2014). Two sides to long-term potentiation: a view towards reconciliation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1633), 20130154. doi:10.1098/rstb.2013.0154
- Padamsey, Z., Tong, R., & Emptage, N. (2017). Glutamate is required for depression but not potentiation of long-term presynaptic function. *eLife*, 6. doi:10.7554/eLife.29688
- Panatier, A., Theodosis, D. T., Mothet, J. P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D. A., & Oliet, S. H. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell*, 125(4), 775-784. doi:10.1016/j.cell.2006.02.051
- Panatier, A., Vallee, J., Haber, M., Murai, K. K., Lacaille, J. C., & Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*, 146(5), 785-798. doi:10.1016/j.cell.2011.07.022
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci*, 33(8), 1351-1365. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 14(6), 383-400. doi:10.1038/nrn3504

- Parpura, V., & Zorec, R. (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev*, 63(1-2), 83-92. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.008
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J. Y., Takano, H., Moss, S. J., McCarthy, K., & Haydon, P. G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*, 310(5745), 113-116. doi:10.1126/science.1116916
- Paulsen, O., & Moser, E. (1998). A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 21(7), 273-278. doi:10.1016/s0166-2236(97)01205-8
- Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Gómez-Urquijo, S. M., Fontaine, C. J., Egaña-Huguet, J., Achicallende, S., Ramos, A., Reguero, L., Elezgarai, I., Nahirney, P. C., Christie, B. R., & Grandes, P. (2019). Endocannabinoid long-term depression revealed at medial perforant path excitatory synapses in the dentate gyrus. *Neuropharmacology*, 153, 32-40. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.04.020
- Perea, G., & Araque, A. (2005). Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*, 38(3-4), 375-382. doi:10.1016/j.ceca.2005.06.015
- Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, 317(5841), 1083-1086. doi:10.1126/science.1144640
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, 32(8), 421-431. doi:10.1016/j.tins.2009.05.001
- Pérez-Otaño, I., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). Presynaptic NMDARs and astrocytes ally to control circuit-specific information flow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(27), 13166-13168. doi:10.1073/pnas.1908293116
- Pérez-Rodríguez, M., Arroyo-García, L. E., Prius-Mengual, J., Andrade-Talavera, Y., Armengol, J. A., Pérez-Villegas, E. M., Duque-Feria, P., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). Adenosine Receptor-Mediated Developmental Loss of Spike Timing-Dependent Depression in the Hippocampus. *Cereb Cortex*, 29(8), 3266-3281. doi:10.1093/cercor/bhy194

Petersen, C. C. (2007). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron*, 56(2), 339-355.
doi:10.1016/j.neuron.2007.09.017

Pigott, B. M., & Garthwaite, J. (2016). Nitric Oxide Is Required for L-Type Ca(2+) Channel-Dependent Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Front Synaptic Neurosci*, 8, 17.
doi:10.3389/fnsyn.2016.00017

Porter, J. T., & McCarthy, K. D. (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci*, 16: 5073-5081.
doi:10.1523/JNEUROSCI.16-16-05073.1996

Pöschel, B., & Stanton, P. K. (2007). Comparison of cellular mechanisms of long-term depression of synaptic strength at perforant path-granule cell and Schaffer collateral-CA1 synapses. *Prog Brain Res*, 163, 473-500. doi:10.1016/S0079-6123(07)63026-X

Pöschel, B., & Manahan-Vaughan, D. (2005). Group II mGluR-induced long term depression in the dentate gyrus in vivo is NMDA receptor-independent and does not require protein synthesis. *Neuropharmacology*, 49 Suppl 1, 1-12. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.06.018

Prius-Mengual, J., Pérez-Rodríguez, M., Andrade-Talavera, Y., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). NMDA Receptors Containing GluN2B/2C/2D Subunits Mediate an Increase in Glutamate Release at Hippocampal CA3-CA1 Synapses. *Mol Neurobiol*, 56(3), 1694-1706.
doi:10.1007/s12035-018-1187-5

Ramón y Cajal, S. (1904). La Textura del Sistema Nervioso del Hombre y los Vertebrados. Moya.

Rex, C. S., Kramar, E. A., Colgin, L. L., Lin, B., Gall, C. M., & Lynch, G. (2005). Long-term potentiation is impaired in middle-aged rats: regional specificity and reversal by adenosine receptor antagonists. *J Neurosci*, 25(25), 5956-5966. doi:10.1523/JNEUROSCI.0880-05.2005

Ribot, J., Breton, R., Calvo, C. F., Moulard, J., Ezan, P., Zapata, J., Samama, K., Moreau, M., Bemelmans, A. P., Sabatet, V., Dingli, F., Loew, D., Milleret, C., Billuart, P., Dallérac, G., & Rouach, N. (2021). Astrocytes close the mouse critical period for visual plasticity. *Science*, 373, 77-81. doi:10.1101/2020.09.30.321497

- Rodríguez-Moreno, A., Banerjee, A., & Paulsen, O. (2010). Presynaptic NMDA Receptors and Spike Timing-Dependent Depression at Cortical Synapses. *Front Synaptic Neurosci*, 2, 18. doi:10.3389/fnsyn.2010.00018
- Rodríguez-Moreno, A., González-Rueda, A., Banerjee, A., Upton, A. L., Craig, M. T., & Paulsen, O. (2013). Presynaptic self-depression at developing neocortical synapses. *Neuron*, 77(1), 35-42. doi:10.1016/j.neuron.2012.10.035
- Rodríguez-Moreno, A., Kohl, M. M., Reeve, J. E., Eaton, T. R., Collins, H. A., Anderson, H. L., & Paulsen, O. (2011). Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *J Neurosci*, 31(23), 8564-8569. doi:10.1523/JNEUROSCI.0274-11.2011
- Rodríguez-Moreno, A., & Paulsen, O. (2008). Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci*, 11(7), 744-745. doi:10.1038/nn.2125
- Rodríguez-Moreno, A., Sistiaga, A., Lerma, J., & Sánchez-Prieto, J. (1998). Switch from Facilitation to Inhibition of Excitatory Synaptic Transmission by Group I mGluR Desensitization. *Neuron*, 21(6), 1477-1486. doi:10.1016/s0896-6273(00)80665-0
- Salin, P. A., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1996). Cyclic AMP Mediates a Presynaptic Form of LTP at Cerebellar Parallel Fiber Synapses. *Neuron*, 16(4), 797-803. doi:10.1016/s0896-6273(00)80099-9
- Sardinha, V. M., Guerra-Gomes, S., Caetano, I., Tavares, G., Martins, M., Reis, J. S., Correia, J. S., Teixeira-Castro, A., Pinto, L., Sousa, N., & Oliveira, J. F. (2017). Astrocytic signaling supports hippocampal-prefrontal theta synchronization and cognitive function. *Glia*, 65(12), 1944-1960. doi:10.1002/glia.23205
- Savtchouk, I., Di Castro, M. A., Ali, R., Stubbe, H., Luján, R., & Volterra, A. (2019). Circuit-specific control of the medial entorhinal inputs to the dentate gyrus by atypical presynaptic NMDARs activated by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(27), 13602-13610. doi:10.1073/pnas.1816013116

- Schiess, A. R., Scullin, C. S., & Partridge, L. D. (2006). Neurosteroid-induced enhancement of short-term facilitation involves a component downstream from presynaptic calcium in hippocampal slices. *J Physiol*, 576(Pt 3), 833-847. doi:10.1113/jphysiol.2006.118505
- Sebastião, A. M., Cunha, R. A., de Mendonça, A., & Ribeiro, J. A. (2000). Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *Br J Pharmacol*, 131(8), 1629-1634. doi:10.1038/sj.bjp.0703736
- Seifert, G., Schilling, K., & Steinhäuser, C. (2006). Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*, 7(3), 194-206. doi:10.1038/nrn1870
- Shigetomi, E., Patel, S., & Khakh, B. S. (2016). Probing the Complexities of Astrocyte Calcium Signaling. *Trends Cell Biol*, 26(4), 300-312. doi:10.1016/j.tcb.2016.01.003
- Sjöström, P. J., Rancz, E. A., Roth, A., & Häusser, M. (2008). Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiol Rev*, 88(2), 769-840. doi:10.1152/physrev.00016.2007
- Sjöström, P. J., Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2003). Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron*, 39(4), 641-654. doi:10.1016/s0896-6273(03)00476-8
- Solstad, T., Boccara, C. N., Kropff, E., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2008). Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science*, 322(5909), 1865-1868. doi:10.1126/science.1166466
- Song, S., & Abbott, L. F. (2001). Cortical development and remapping through spike timing-dependent plasticity. *Neuron*, 32(2), 339-350. doi:10.1016/s0896-6273(01)00451-2
- Song, S., Miller, K. D., & Abbott, L. F. (2000). Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Nat Neurosci*, 3(9), 919-926. doi: 10.1038/78829
- Stepan, J., Dine, J., & Eder, M. (2015). Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP. *Front Neurosci*, 9, 160. doi:10.3389/fnins.2015.00160
- Sultan, S., Li, L., Moss, J., Petrelli, F., Cassé, F., Gebara, E., Lopatar, J., Pfrieger, F. W., Bezzi, P., Bischofberger, J., & Toni, N. (2015). Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal

- Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes. *Neuron*, 88(5), 957-972. doi:10.1016/j.neuron.2015.10.037
- Tovote, P., Fadok, J. P., & Luthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci*, 16(6), 317-331. doi:10.1038/nrn3945
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., . . . Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*, 62(3), 405-496. doi:10.1124/pr.109.002451
- Valverde, F. (2002). Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Revista de Neurología*, 34(08). doi:10.33588/rn.3408.2002088
- Verkhratsky, A., & Parpura, V. (2014). History of electrophysiology and the patch clamp. *Methods Mol Biol*, 1183, 1-19. doi:10.1007/978-1-4939-1096-0_1
- Wall, M. J., & Dale, N. (2013). Neuronal transporter and astrocytic ATP exocytosis underlie activity-dependent adenosine release in the hippocampus. *J Physiol*, 591(16), 3853-3871. doi:10.1113/jphysiol.2013.253450
- Wilson, D. I., Langston, R. F., Schlesiger, M. I., Wagner, M., Watanabe, S., & Ainge, J. A. (2013). Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus*, 23(5), 352-366. doi:10.1002/hipo.22095
- Witter, M. P. (2007). The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163, 43-61. doi:10.1016/S0079-6123(07)63003-9
- Yang, K., & Dani, J. A. (2014). Dopamine D1 and D5 receptors modulate spike timing-dependent plasticity at medial perforant path to dentate granule cell synapses. *J Neurosci*, 34(48), 15888-15897. doi:10.1523/JNEUROSCI.2400-14.2014
- Zhang, Q., Pangrsic, T., Kreft, M., Krzan, M., Li, N., Sul, J.Y., Halassa, M., Van Bockstaele, E., Zorec, R., & Haydon, P.G. (2004). Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem* 279, 12724-12733
- Zhou, B., Zuo, Y. X., & Jiang, R. T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther*, 25(6), 665-673. doi:10.1111/cns.13123

Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 64, 355-405. doi:10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547

zur Nedden, S., Hawley, S., Pentland, N., Hardie, D. G., Doney, A. S., & Frenguelli, B. G. (2011). Intracellular ATP influences synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampus via metabolism to adenosine and activity-dependent activation of adenosine A1 receptors. *J Neurosci*, 31(16), 6221-6234. doi:10.1523/JNEUROSCI.4039-10.2011

VIII. Anexos

Adenosine and Astrocytes Determine the Developmental Dynamics of Spike Timing-Dependent Plasticity in the Somatosensory Cortex

Irene Martínez-Gallego,¹ Mikel Pérez-Rodríguez,^{1*} Heriberto Coatl-Cuaya,^{1*} Gonzalo Flores,² and Antonio Rodríguez-Moreno¹

¹Laboratory of Cellular Neuroscience and Plasticity, Department of Physiology, Anatomy and Cell Biology, Universidad Pablo de Olavide, ES-41013 Seville, Spain, and ²Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla CP 72570, México

During development, critical periods of synaptic plasticity facilitate the reordering and refinement of neural connections, allowing the definitive synaptic circuits responsible for correct adult physiology to be established. The L4–L2/3 synapses in the somatosensory cortex (S1) exhibit a presynaptic form of spike timing-dependent long-term depression (t-LTD) that probably fulfills a role in synaptic refinement. This t-LTD persists until the fourth postnatal week in mice, disappearing thereafter. When we investigated the mechanisms underlying this maturation-related loss of t-LTD in either sex mouse slices, we found that it could be completely recovered by antagonizing adenosine type 1 receptors. By contrast, an agonist of A₁R impeded the induction of t-LTD at P13–27. Furthermore, we found that the adenosine that mediated the loss of t-LTD at the end of the fourth week of development is most probably supplied by astrocytes. At more mature stages (P38–60), we found that the protocol used to induce t-LTD provokes t-LTP. We characterized the mechanisms underlying the induction of this form of LTP, and we found it to be expressed presynaptically, as witnessed by paired-pulse and coefficient of variation analysis. In addition, this form of presynaptic t-LTP requires the activation of NMDARs and mGlu1Rs, and the entry of Ca²⁺ into the postsynaptic neuron through L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels. Nitric oxide is also required for t-LTP as a messenger in the postsynaptic neuron as are the adenosine and glutamate that are released in association with astrocyte signaling. These results provide direct evidence of the mechanisms that close the window of plasticity associated with t-LTD and that drive the switch in synaptic transmission from t-LTD to t-LTP at L4–L2/3 synapses, in which astrocytes play a central role.

Key words: adenosine; astrocyte; barrel cortex; critical period; glutamate; spike timing-dependent plasticity

Significance Statement

During development, critical periods of plasticity facilitate the reordering and refining of neural connections, allowing correct adult physiology to be established. The L4–L2/3 synapses in the somatosensory cortex exhibit a presynaptic form plasticity (LTD) that probably fulfills a role in synaptic refinement. It is present until the fourth postnatal week in mice, disappearing thereafter. The mechanisms that are responsible for this loss of plasticity are not clear. We describe here these mechanisms and those involved in the switch from LTD to LTP observed as the brain matures. Defining these events responsible for closing (and opening) plasticity windows may be important for brain repair, sensorial recovery, the treatment of neurodevelopmental disorders, and for educational policy.

Received Jan. 17, 2022; revised Apr. 18, 2022; accepted May 18, 2022.

Author contributions: A.R.-M. designed research; I.M.-G., M.P.-R., and H.C.-C. performed research; G.F. analyzed data; A.R.-M. wrote the paper.

This work was supported by grants from the Spanish Agencia Estatal de Investigación/FEDER (Grant PID 2019-107677GB-I00) and the Junta de Andalucía/FEDER (Grant P20-00881), and Andalusian Government (Grants UPO-1258682 and P18-H0-4625) to A.R.-M. I.M.-G. was supported by a Formación de Profesorado Universitario PhD Fellowship from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. M.P.-R. was supported by a PhD Fellowship from the Basque Regional Government. H.C.-C. was supported by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) Fellowship for short-term visits. We thank Dr. Cristina Calvino for technical assistance, Prof. Philip Haydon and Dr. Joao Oliveira for sharing the dn-SNARE mice lines, and Dr. Mark Sefton for editorial assistance.

*M.P.-R. and H.C.-C. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Antonio Rodríguez-Moreno at arodmor@upo.es.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0115-22.2022>

Copyright © 2022 the authors

Introduction

One of the most interesting properties of the mammalian brain is its ability to change in response to experience. This phenomenon, called plasticity (Ramón y Cajal, 1894), underlies the reorganization of cortical maps during development, as well as learning and memory processes in adults (Citri and Malenka, 2008; Bliss et al., 2014). Throughout development, activity and sensory-dependent plastic changes occur during permissive and critical periods, wherein environmental influences shape brain circuits and refine neural connections into the definitive adult circuits (Hensch, 2004, 2005). The closing of such permissive windows is associated with the loss of plasticity at particular

synapses, producing specific functional effects (Hensch, 2004). Long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) of synaptic transmission are the two best-known forms of plasticity. Spike timing-dependent plasticity (STDP) is a Hebbian form of synaptic plasticity detected in all species studied, from insects to humans, and it is a strong candidate to drive circuit remodeling during development, as well as learning and memory in adults (Debanne et al., 1994, 1998; Markram et al., 1997; Bi and Poo, 1998; Feldman, 2000, 2012). In STDP, the order and relative timing of presynaptic and postsynaptic action potentials (APs; spikes) determine the direction and magnitude of the synaptic changes. Thus, spike timing-dependent LTP (t-LTP) occurs when a presynaptic spike is followed by a postsynaptic spike, whereas spike timing-dependent LTD (t-LTD) is induced when this order is inverted, although some exceptions to this do exist (Feldman, 2012; Brzosko et al., 2019).

Presynaptic forms of t-LTD have been described in the visual and somatosensory cortices and in the hippocampus (Corlew et al., 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2010; Brzosko et al., 2019). These forms of t-LTD are expressed presynaptically, and they disappear during the third to fifth weeks of postnatal development (Corlew et al., 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2010; Andrade-Talavera et al., 2016; Bouvier et al., 2018; Brzosko et al., 2019; Pérez-Rodríguez et al., 2019). In the mouse barrel cortex, presynaptic t-LTD is lost by the fourth week of postnatal day (P) development (\approx P25–42; Banerjee et al., 2009). This t-LTD is known to be dependent on postsynaptic Ca^{2+} , L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels, mGlu5 receptor activation, phospholipase C, postsynaptic IP₃ receptor-mediated Ca^{2+} release from internal stores, postsynaptic endocannabinoid (eCB) synthesis, and activation of CB₁ receptors and astroglial signaling that delivers glutamate to NMDARs during its induction (Bender et al., 2006; Nevian and Sakmann, 2006; Brasier and Feldman, 2008; Rodríguez-Moreno and Paulsen, 2008; Min and Nevian, 2012; Rodríguez-Moreno et al., 2013; Banerjee et al., 2014). To date, it remains unclear what mechanisms are responsible for the loss of this plasticity during the fourth week of development (Banerjee et al., 2009). Moreover, it is unclear whether the closure of this window of plasticity is reversible or not and whether it is permanent, persisting throughout the lifetime of the animal. Defining the events responsible for closing plasticity windows is important when studying the brain responses to experience and injury. Indeed, defining such processes may have important implications for brain repair, sensorial recovery, the treatment of neurodevelopmental disorders, and even for educational policy.

Here, we studied the mechanisms driving the loss of t-LTD observed as L4–L2/3 synapses mature in the mouse barrel cortex using whole-cell patch-clamp recordings. As described previously, we found that t-LTD can be induced at L4–L2/3 synapses in young mice (P13–27) and that it is lost at the end of the fourth week of development (P28–37). We discovered that this developmental loss of t-LTD can be reversed by antagonizing adenosine type 1 receptors (A₁Rs) and, conversely, that the induction of t-LTD is impaired between P13 and P27 in the presence of an A₁R agonist. In addition, we found that the adenosine that mediates the loss of t-LTD at the end of the fourth week of development is released as a result of astrocyte signaling. We also explored what occurs after P37 at S1 L4–L2/3 synapses and, interestingly, we found that a post-before-pre protocol that induces t-LTD at P13–27 fails to induce plasticity at P28–37, although it does induce t-LTP at P38–60. Characterizing this form of t-LTP, the result of a switch from presynaptic t-LTD, paired-pulse ratio (PPR), and coefficient of variation (CV) analyses demonstrate its

presynaptic nature. This t-LTP requires the activation of NMDARs and mGluR1, as well as a calcium flux through postsynaptic L-type calcium channels, calcium release from intracellular stores and signaling by nitric oxide (NO) as a retrograde messenger. The switch from presynaptic t-LTD to t-LTP is mediated by the activation of presynaptic A₁Rs by adenosine released as a result of astrocyte signaling. Finally, astrocytes seem to induce t-LTP not only by releasing adenosine but also by supplying glutamate. Thus, we reveal here the mechanisms underlying t-LTD loss during maturation and a developmental switch from presynaptic depression to presynaptic potentiation of synaptic transmission as the S1 matures, defining the mechanisms by which this form of t-LTP is induced.

Materials and Methods

Mice. All animal procedures were conducted in accordance with the European Union Directive 2010/63/EU regarding the protection of animals used for scientific purposes, and they were approved by the Ethics Committee of the Universidad Pablo de Olavide and the Ethics Committee of the Andalusian Government. C57BL/6 mice were obtained from Harlan Laboratories (Spain), and P13–60 mice of either sex were used. Animals were kept on a continuous 12 h light/dark cycle, at temperatures between 18 and 24°C, at 40–60% humidity, and with *ad libitum* access to food and water. In some experiments, dominant-negative (dn) SNARE mice (Pascual et al., 2005; Sardinha et al., 2017) of the same ages were used. These mice were not fed with doxycycline from birth, the supplement that drives transgene expression. In these mice, the human glial fibrillary acidic protein promoter mediates the expression of the tetracycline transactivator specifically in astrocytes, which in turn activates the tetracycline responsive element operator and drives the cytosolic expression of VAMP2/synaptobrevin II, as well as the enhanced green fluorescence protein. Expression of the dnSNARE transgene interferes with the formation of the SNARE complex, resulting in a blockade of exocytosis and impaired vesicular release in astrocytes (Sultan et al., 2015).

Slice preparation. Slices containing the barrel subfield of the somatosensory cortex were prepared as described previously (Agmon and Connors, 1991; Rodríguez-Moreno et al., 2013; Banerjee et al., 2014). Briefly, mice were anesthetized with isoflurane (2%) and decapitated, and their whole brain was removed and placed in an ice-cold solution containing the following (in mM, 300 mOsm L^{-1}): 126 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 glucose, pH 7.2. Slices (350 μm thick, Leica VT1000S Vibratome) were maintained oxygenated (95% O₂/5% CO₂) in the same solution for at least 1 h before use. Experiments were conducted at 30–34°C, during which the slices were superfused continuously with the solution indicated above.

Electrophysiological recordings. Slices containing the barrel cortex were identified and selected under a stereomicroscope. Two monopolar stimulation electrodes were placed at the base of a barrel (L4), and whole-cell patch-clamp recordings were obtained from L2/3 pyramidal cells located in the same barrel column with 5–7 M Ω borosilicate pipettes. The pipette solution contained the following (in mM, 290 mOsm L^{-1}): 110 potassium gluconate, 40 HEPES, 4 NaCl, 4 ATP-Mg, and 0.3 GTP, pH 7.2–7.3. Cells with a pyramidal-shaped soma were selected for recording using infrared, differential interference contrast optics. The neurons were verified as pyramidal cells through their characteristic regular spiking responses to positive current injection. Whole-cell recordings were obtained with an Axon MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices). Only cells with a stable resting membrane potential below -55 mV were assessed, and the cell recordings were excluded from the analysis if the series resistance changed by $>15\%$. All recordings were low-pass filtered at 3 kHz and acquired at 10 kHz, and all the experiments were performed in current-clamp mode. To study plasticity, EPSPs were evoked alternately through two input pathways, test and control, each at 0.2 Hz. Stimulating electrodes were situated 200–400 μm from the cell soma, and the EPSPs were induced using brief current pulses (200 μs , 0.1–0.2 mA). Stimulation was adjusted to obtain an EPSP peak amplitude of $\sim 3\text{--}5\text{ mV}$ in control conditions, and pathway independence was ensured by the lack of cross-facilitation when the pathways were

stimulated alternately at 50 ms intervals. Plasticity was assessed through the changes in the EPSP slope, measured in its rising phase as a linear fit between time points, corresponding to 25–30% and 70–75% of the peak amplitude under control conditions.

Plasticity protocols. After establishing a stable basal EPSP over 10 min, the test input was paired 100 times with a single postsynaptic spike. The single postsynaptic spike was evoked by a brief somatic current pulse (5 ms, 0.1–0.5 pA), whereas the control pathway was unstimulated during the pairing period. To induce t-LTD, the postsynaptic AP was evoked 18 ms before the onset of the EPSP. EPSP slopes were monitored for at least 30 min after the pairing protocol, and the presynaptic stimulation frequency remained constant throughout the experiment. Where appropriate, glutamate puffs were applied using a Picospritzer (Parker Hannifin). Glutamate was dissolved in the external solution and puffed through a micropipette over an astrocyte at a pressure of 10 psi for 50–200 ms, which did not affect patch clamping. For each experiment, 50–100 glutamate puffs were applied at 0.2 Hz after the recording neuron at baseline, 18 ms before the onset of the EPSP. EPSP slopes were monitored for 30 min after the protocol. In some experiments, different timings were used.

Pharmacology. The following compounds used here were purchased from Sigma-Aldrich: BAPTA (20 mM; catalog #A4926), N⁶-Cyclopentyladenosine (CPA; 60 nM; catalog #119135), and GDP β S (1 mM; catalog #G7637), as well as all the salts used to prepare the internal and external solutions. The following compounds were purchased from Tocris Bioscience: (+)-MK-801 maleate (500 μ M; catalog #0924), d-AP5 (50 μ M; catalog #0106), 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (8-CPT; 2 μ M; catalog #6137), cPTIO (100 μ M; catalog #0772), L-glutamic acid (100 μ M; catalog #0218), LY367385 (100 μ M; catalog #1237), LY341495 (100 μ M; catalog #1209), L-NAME (100 μ M; catalog #0665), DETA NONOate (5 mM; catalog #6077), nimodipine (10 μ M; catalog #0600), thapsigargin (10 μ M; catalog #1138), bicuculline (10 μ M; catalog #0130), and SCH50911 (20 μ M; catalog #0984). These compounds were all dissolved in water except 8-CPT, nimodipine, and thapsigargin, which were dissolved in DMSO.

Data analysis. The data were analyzed with Clampfit 10.2 software (Molecular Devices), and the last 5 min of recording were used to estimate the changes in synaptic efficacy relative to the baseline. For the PPR experiments, two EPSPs were evoked for 30 s at the baseline frequency, at the beginning of the baseline recording (40 ms apart), and again 30 min after the end of the pairing protocol. The PPR was expressed as the slope of the second EPSP divided by the slope of the first EPSP. A CV analysis was conducted on the EPSP slopes (Rodríguez-Moreno and Paulsen, 2008).

The noise-free CV of the EPSP slopes was calculated as follows:

$$CV = \sqrt{\sigma^2(\text{EPSP}) - \sigma^2(\text{noise})}/\text{EPSP slope},$$

where $\sigma^2(\text{EPSP})$ and $\sigma^2(\text{noise})$ are the variance of the EPSP and baseline, respectively. The plot compares the variation in the mean EPSP slope (M) to the change in response variance of the EPSP slope ($1/CV^2$). A comprehensive explanation can be found in Brock et al. (2020). Graphs were obtained using SigmaPlot 11.0.

Statistical analysis. For any comparisons between two groups a Mann–Whitney *U* test or Wilcoxon signed-rank test was used, as appropriate. For multiple comparisons to the same control, a Kruskal–Wallis test was used. The data are expressed as mean \pm SEM, and *p* values <0.05 were considered significant, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

Results

t-LTD is induced in juvenile but not in young adult mice

We first confirmed that pairing presynaptic stimulation with single postsynaptic spikes at low frequency induces t-LTD at L4–L2/3 synapses. In slices prepared from the mouse barrel cortex at P13–27, the EPSPs evoked by extracellular stimulation of L4

axons were monitored by whole-cell recording of L2/3 pyramidal cells, as described previously (Rodríguez-Moreno and Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2011, 2013; Fig. 1*A,B*). Accordingly, t-LTD was induced in current-clamp mode using 100 pairings of single EPSPs and single postsynaptic spikes at 0.2 Hz. A post-before-pre pairing protocol (post-pre protocol), with a postsynaptic spike occurring \sim 18 ms before the presynaptic stimulation, induced robust t-LTD ($68 \pm 5\%$, $n = 8$), whereas an unpaired control pathway remained unchanged ($101 \pm 6\%$, $n = 8$; Fig. 1*B,C*). We studied the age profile of this form of t-LTD, confirming that t-LTD can be induced until P27 ($63 \pm 4\%$ at P13–19, $n = 6$; $68 \pm 8\%$ at P20–27, $n = 6$; Fig. 1*D,E*), as reported previously (Banerjee et al., 2009), disappearing at the end of the fourth week and during the fifth week of development ($104 \pm 7\%$ at P28–37, $n = 7$; Fig. 1*D,E*). Changes in the timing between presynaptic and postsynaptic activity during maturation could provoke the loss of plasticity during development. We tested this hypothesis using two additional time gaps between presynaptic and postsynaptic activity as a protocol to induce t-LTD, -25 and -10 ms. As occurred with a -18 ms gap, strong t-LTD was observed at P13–27 with both a -25 and -10 ms post-pre pairing ($71 \pm 3\%$, $n = 6$, and $71 \pm 5\%$, $n = 8$, respectively), whereas t-LTD was lost at P28–37 in both cases ($95 \pm 3\%$, $n = 7$, and $103 \pm 8\%$, $n = 7$; Fig. 1*F,G*). Hence, this form of t-LTD seems to be related to a specific developmental period as it cannot be induced after that, even with different spike-timing intervals.

The developmental loss of t-LTD involves enhanced inhibition mediated by the activation of adenosine A₁ type receptors
GABAergic inhibition is an important regulator of plasticity (Paulsen and Moser, 1998), and it augments as development proceeds (Banks et al., 2002). Thus, GABAergic inhibition is involved in the developmental changes in LTP induction in the hippocampus (Meredith et al., 2003) and auditory cortex (Chun et al., 2013), and it may mediate closure of the t-LTD window in the visual cortex (Hensch, 2005). To assess whether enhanced GABAergic inhibition could account for the developmental loss of t-LTD, we repeated the t-LTD experiments at P28–37 in the presence of the GABA_A receptor antagonist bicuculline (10 μ M) or the GABA_B receptor antagonist SHC50911 (20 μ M). We found that t-LTD was still lost under these experimental conditions (bicuculline $92 \pm 8\%$, $n = 7$; SHC50911 $120 \pm 6\%$, $n = 7$; Fig. 2*A,B*), indicating that enhanced GABAergic inhibition does not induce t-LTD loss at L4–L2/3 synapses at the end of the fourth week of development. Similarly, the presence of bicuculline (10 μ M) or SHC50911 (20 μ M) did not affect t-LTD at P13–27 (bicuculline $72 \pm 5\%$, $n = 6$; SHC50911 $79 \pm 6\%$, $n = 8$, vs $63 \pm 4\%$, $n = 9$, in untreated slices; Fig. 2*C,D*).

Adenosine participates in the gating of synaptic plasticity in the adult hippocampus (Arai et al., 1990; de Mendonça and Ribeiro, 1994; Rex et al., 2005; zur Nedden et al., 2011). Moreover, it has been reported that the concentration of extracellular adenosine increases during development (Sebastião et al., 2000; Rex et al., 2005; Kerr et al., 2013) and that this increase in adenosine may affect synaptic efficacy and t-LTD. In the hippocampus, it was recently found that adenosine activating presynaptic A₁Rs closes the windows of plasticity at CA3–CA1 synapses (Pérez-Rodríguez et al., 2019). To determine whether enhanced inhibition mediated by A₁R activation occurs as the somatosensory cortex matures, we assessed the effect of the A₁R antagonist 8-CPT (2 μ M) on the EPSP slope at P13–27 and P28–37. This

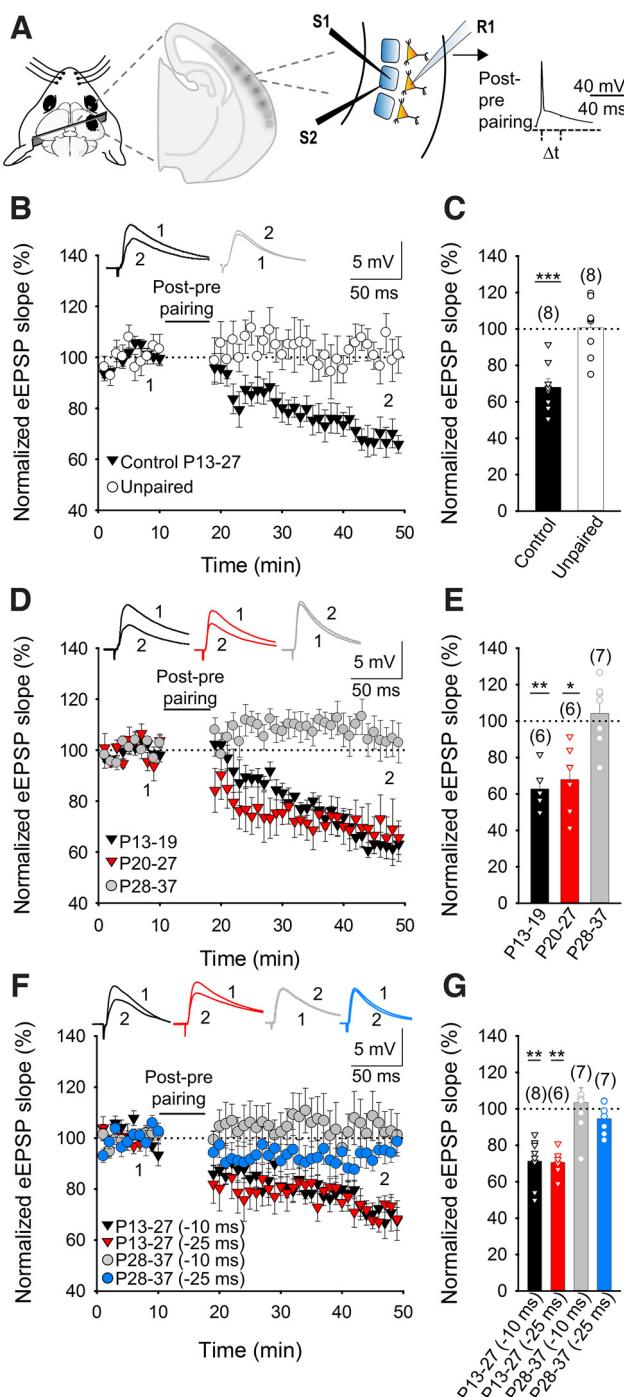


Figure 1. Input-specific spike timing-dependent LTD at L4-L2/3 synapses of the somatosensory cortex is present at P13–27 but not at P28–37. **A**, Left, Scheme showing the general experimental setup, R, Recording electrode; S1, S2, stimulating electrodes. Right, Pairing protocol used (Δt , time between EPSP onset and peak of spike). **B**, A post-pre-single-spike pairing protocol induced t-LTD. The EPSP slopes monitored in the paired (black triangles) and unpaired pathway (open circles) are shown. Traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. Depression was only observed in the paired pathway. **C**, Summary of the results. The t-LTD is evident during the second and third week of development, but it disappears during the fourth week. **D**, The EPSP slopes monitored at P13–19 (black triangles), P20–27 (red triangles), and P28–37 (gray circles) are shown. Traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **E**, Summary of the results. **F**, The loss of t-LTD is not because of a shift in the coincidence time window to induce t-LTD. Using timings between presynaptic and postsynaptic activity to induce t-LTD that were shorter and longer than -18 ms (-10 and -25 ms), t-LTD is evident at P13–27 and lost at P28–37. The EPSP slopes monitored at P13–27 (black and red triangles) and P28–37 (gray and blue circles) are shown. Traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **G**, Summary of the

antagonist produced a small increase in the EPSP slope at P13–27 ($114 \pm 5\%$, $n = 6$) and a robust effect at P28–37 ($153 \pm 8\%$, $n = 6$; Fig. 2E), indicating that A₁R activation enhances inhibition as development proceeds. By activating presynaptic A₁Rs, adenosine exerts a potent inhibitory effect on glutamatergic synaptic transmission (Dunwiddie and Masino, 2001). Thus, the loss of t-LTD at P28–37 might be because of stronger inhibition of glutamate release mediated by presynaptic A₁R activation, as recently described in the hippocampus (Pérez-Rodríguez et al., 2019). To test this, we confirmed that the effects observed were mediated by presynaptic A₁Rs by analyzing the PPR in cortical slices treated with 8-CPT (2 μM). A decrease in the PPR was observed at both P13–27 (from 1.89 ± 0.16 at baseline to 1.4 ± 0.14 in the presence of 8-CPT, $n = 6$) and P28–37 ($2.01 \pm 0.21\%$ baseline, 1.44 ± 0.12 8-CPT, $n = 6$; Fig. 2F), indicative of a presynaptic effect. We then determined whether this increase in A₁R-mediated inhibition during development affected t-LTD, studying slices from P28–37 mice that lack t-LTD. A post-before pre protocol induced t-LTD in slices exposed to 8-CPT (2 μM ; $80 \pm 7\%$ vs $106 \pm 6\%$ in interleaved control slices, $n = 8$; Fig. 2A,B), indicating that the lack of t-LTD observed was provoked by enhanced inhibition mediated by A₁R activation. In the presence of 8-CPT (2 μM), t-LTD was not affected at P13–27 ($63 \pm 4\%$, $n = 9$, in the presence and $61 \pm 7\%$, $n = 7$, in the absence of 8-CPT; Fig. 2C,D) and, hence, the activation of presynaptic A₁Rs by adenosine appears to dampen glutamate release and prevent the induction of t-LTD.

A₁R activation at P13–P27 closes the window of plasticity

If the increase in the concentration of extracellular adenosine as development proceeds more strongly activates presynaptic A₁Rs at L4–L2/3 synapses, provoking the loss of t-LTD at P28–37, it should be possible to close the window of plasticity earlier by prematurely enhancing A₁R activation (e.g., at P13–27 when t-LTD is robust). Indeed, the induction of t-LTD was in fact impaired when slices from P13–27 animals were maintained for 1 h in the presence of the A₁R agonist (2R,3R,4S,5R)-2-(6-(cyclopentylamino)-9H-purin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydropuran-3,4-diol, CPA, 30 nm (96 \pm 5%, $n = 11$, vs 59 \pm 6%, $n = 7$, in interleaved untreated slices; Fig. 2G,H). Hence, presynaptic A₁R inhibition during development appears to be crucial for the plastic properties of these synapses.

The developmental loss of t-LTD requires astrocyte signaling to produce an increase in adenosine levels

The role of adenosine in activating presynaptic A₁Rs and driving the developmental loss of t-LTD in the somatosensory cortex raises interest in the source of this nucleoside. It is known that equilibrative nucleoside transporters can stimulate adenosine release from neurons and that an important part of the adenosine released in the nervous system arises from extracellular metabolism of the ATP released by astrocytes (Dunwiddie and Masino, 2001; Wall and Dale, 2013). Astrocyte activation may provoke the release of glutamate (Min and Nevian, 2012) and other gliotransmitters, such as D-Serine (Andrade-Talavera et al., 2016), as well as that of ATP or adenosine (Araque et al., 2014). We investigated the possible involvement of astrocytes in the release of adenosine that activates presynaptic A₁Rs and in the subsequent loss of t-LTD during development at L4–L2/3 synapses of the barrel cortex. If ATP/adenosine released by

<

results. Error bars indicate SEM, and the number of slices is shown in parentheses. Mann-Whitney *U* test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

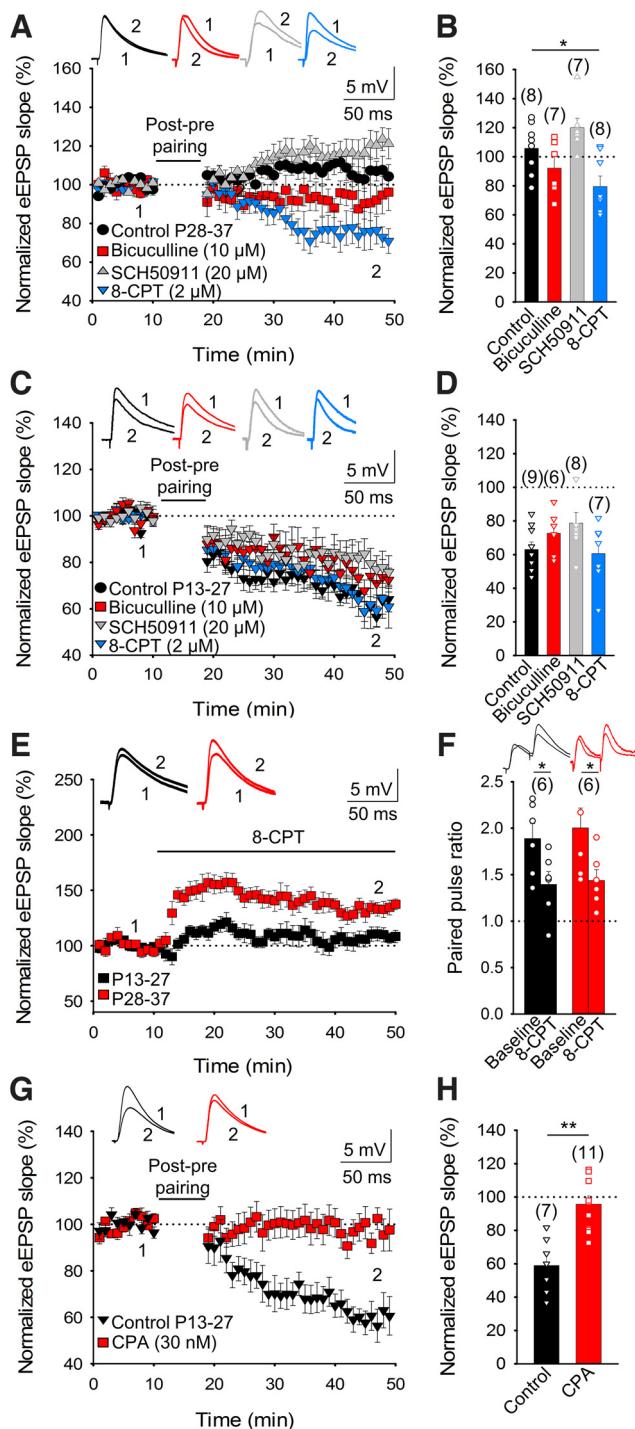


Figure 2. The developmental loss of t-LTD involves an increase in the inhibition of A1-type receptor activation by adenosine. **A**, The loss of t-LTD is because of the activation of A1Rs and not the activation of GABA_A or GABA_B receptors. The t-LTD lost at P28–37 was not recovered in the presence of bicuculline (red squares) or SCH50911 (gray triangles), whereas the LTD lost is recovered completely in the presence of the A1R antagonist 8-CPT (blue triangles). Inset, The EPSP before (1) and 30 min after (2) postpairing/prepairing in control conditions (black circles) and in the presence of bicuculline (10 μ M, red squares), SCH50911 (20 μ M, gray triangles), or 8-CPT (2 μ M, blue triangles). **B**, Summary of the results. **C**, At P13–27, t-LTD does not require the activation of A1Rs, GABA_A, or GABA_B receptors. The addition of 8-CPT (2 μ M, blue triangles), bicuculline (10 μ M, red triangles), or SCH50911 (20 μ M, gray triangles) to the superfusion solution does not prevent t-LTD induction (black triangles). Insets, The EPSP before (1) and 30 min after (2) postpairing/prepairing. **D**, Summary of the results. Presynaptic A1R-mediated inhibition increases with maturation. **E**, The 8-CPT affects the evoked EPSP slope distinctly at P13–27 (black squares) and P28–37 (red squares). **F**,

astrocytes, possibly as a result of astrocyte activation, is involved in this loss of t-LTD during development, and this ATP/adenosine is released in vesicles, impeding vesicle release by astrocytes should prevent the effects of adenosine and favor the maintenance of t-LTD. Indeed, when individual astrocytes from P28–37 mice were loaded with the Ca²⁺ chelator BAPTA (20 mM) via the patch pipette to inhibit vesicle and Ca²⁺-dependent gliotransmitter release, t-LTD was recovered (74 \pm 6%, n = 8, vs 106 \pm 5%, n = 8; Fig. 3A,B,C). However, this recovery of t-LTD was impeded when the BAPTA-loaded astrocytes were exposed to the A₁R agonist CPA (100 \pm 5%, n = 8; Fig. 3B, C). In addition, we tested the effect of CPA (30 nM) on basal synaptic transmission at P13–27 and P28–37, demonstrating that CPA affected the EPSP slope similarly at both stages of maturation (39 \pm 6% at P13–27 and 44 \pm 6% at P28–37, n = 5). Together, these results indicate that astrocytes and adenosine, or its precursor ATP, were responsible for the loss of t-LTD at P28–37.

To gain more insight into the role of astrocytes in the possible release of the ATP/adenosine that affects presynaptic glutamate release, we performed dual recordings in astrocytes and neighboring pyramidal neurons, monitoring the time course of the EPSP slope evoked by basal stimulation at 0.2 Hz at P13–27 and P28–37. At P13–27, direct stimulation of astrocytes (depolarization from -80 mV to 0 mV at 0.4 Hz for 10 min) produced a clear decrease in the eEPSP slope (71 \pm 6%, n = 7; Fig. 3D,E), which was not evident in the presence of 8-CPT (2 μ M; 99 \pm 7%, n = 7; Fig. 3D,E). A decrease in the EPSP slope was also observed at P28–37 when astrocytes were stimulated (78 \pm 4%, n = 7; Fig. 3G,H), and again, astrocyte stimulation did not affect EPSP slope in the presence of 8-CPT (98 \pm 4%, n = 7; Fig. 3G,H). We also found a clear increase in PPRs after astrocyte stimulation at P13–27 (from 1.20 \pm 0.14 at baseline to 1.70 \pm 0.15, n = 6; Fig. 3F) and P28–37 (from 1.50 \pm 0.25 at baseline to 1.90 \pm 0.35, n = 6; Fig. 3I), indicating a presynaptic mechanism for this decrease in the EPSP slope. Together, these results indicate that the release of ATP/adenosine after astrocyte stimulation altered the probability of glutamate release through the activation of presynaptic A₁Rs, influencing the loss of t-LTD during development and closing the window of plasticity at L4–L2/3 synapses.

A switch from t-LTD to t-LTP at P38–60

A switch from t-LTD to t-LTP has been recently described in the hippocampus after t-LTD loss (Falcón-Moya et al., 2020), and, thus, we assessed whether a similar switch operates in the somatosensory cortex at L4–L2/3 synapses. We studied these synapses at older ages using a post-pre protocol, with a postsynaptic spike arising \sim 18 ms before the presynaptic stimulation was applied. A robust t-LTD was induced at P13–27 with this protocol, yet there was no plasticity at P28–37, whereas robust t-LTP was provoked when the protocol was applied at P38–60 (139 \pm 4%, n = 6, vs 102 \pm 5%, n = 6, in the

←

Effect of 8-CPT on the PPR. Note that 8-CPT produces a decrease in the PPR at P13–27 and P28–37. An increase in A1R mediated-inhibition closes the window of plasticity for t-LTD at P13–27. **G**, Activation of A1Rs at P13–27 by the agonist CPA prevented the induction of t-LTD. The evoked EPSP slopes monitored in control slices (black triangles) and in slices treated with the A1R agonist CPA (30 nM, red squares) following a postpairing/prepairing are shown. The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing in control slices, and in slices treated with CPA. **H**, Summary of the results. Error bars indicate SEM, and the number of slices is shown in parentheses. Kruskal–Wallis test (**B**, **D**), Wilcoxon signed-rank test (**F**), and Mann–Whitney *U* test (**H**); * p < 0.05, ** p < 0.01.

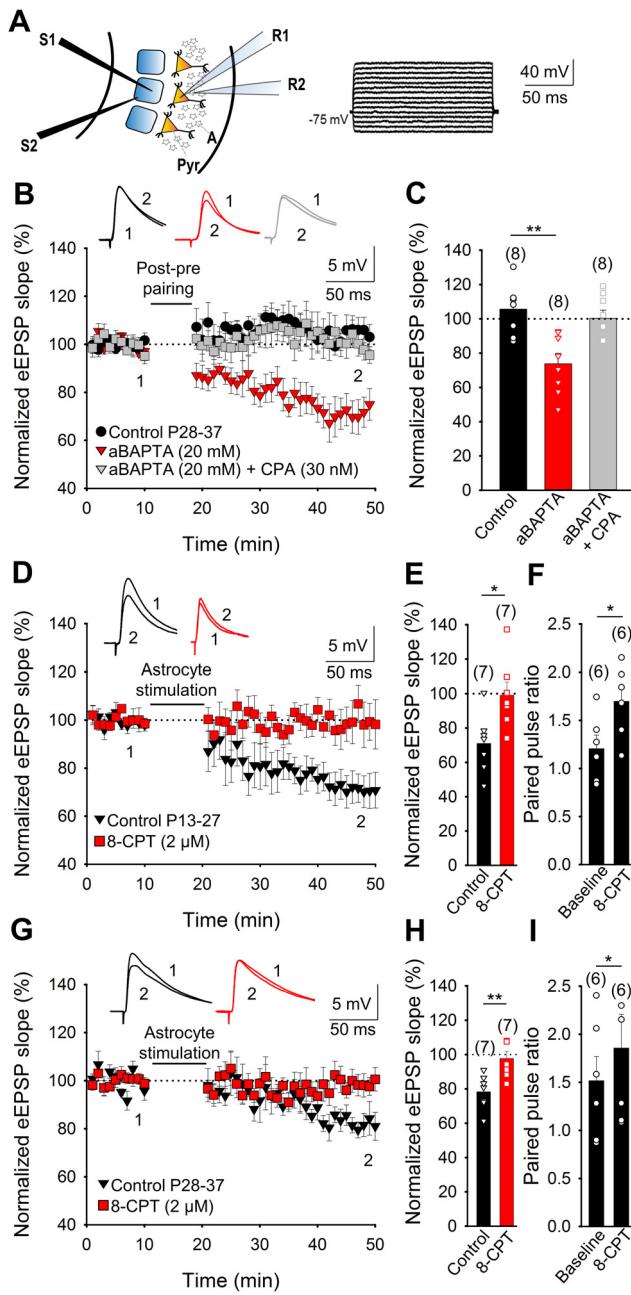


Figure 3. The adenosine involved in preventing t-LTD at P28–37 comes from astrocytes. Astrocytes are required for the loss of t-LTD with maturation. **A**, Left, Scheme showing the general experimental setup: R1, R2, Recording electrodes; S1, S2, stimulating electrodes; Pyr, pyramidal neuron; A, astrocyte. Right, Voltage responses of an astrocyte shown in current clamp. **B**, In astrocyte-neuron dual recordings with the astrocyte loaded with the calcium chelator BAPTA (20 mM) via the recording pipette (aBAPTA), a postpairing/prepairing protocol induces t-LTD (red triangles) yet not in control conditions (no aBAPTA, black circles). The presence of CPA (30 nM) impaired the t-LTD observed with aBAPTA (gray squares). The traces show the EPSP before (1) and 30 min after pairing (2). **C**, Summary of the results. **D–F**, Astrocyte stimulation affects the EPSP slope in neighboring pyramidal neurons at L4–L2/3 synapses. Performing dual recordings in astrocytes and neighboring pyramidal neurons, and monitoring the slope of EPSP evoked by basal stimulation at 0.2 Hz at P13–27 and P28–37 indicated a clear decrease in the slope of the eEPSP when the astrocyte was directly stimulated at P13–27 (depolarized from -80 mV to 0 mV at 0.4 Hz for 10 min ; **D**, **E**). An increase in PPR was observed after astrocyte stimulation (**F**). In slices treated with 8-CPT ($2\text{ }\mu\text{M}$), astrocyte stimulation did not affect the EPSP slope (**D**, **E**). At P28–37, a decrease in the EPSP slope was also observed in untreated slices, whereas in the presence of 8-CPT, no effect on the EPSP slope was again observed after stimulation of the astrocyte (**G**, **H**). In the untreated slices an increase in PPR was observed after astrocyte stimulation (**I**). Error bars indicate SEM, and the number of slices is shown in parentheses. Kruskal–Wallis test (**C**), Mann–Whitney *U* test (**E**, **H**), and Wilcoxon signed-rank test (**F**, **I**); **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

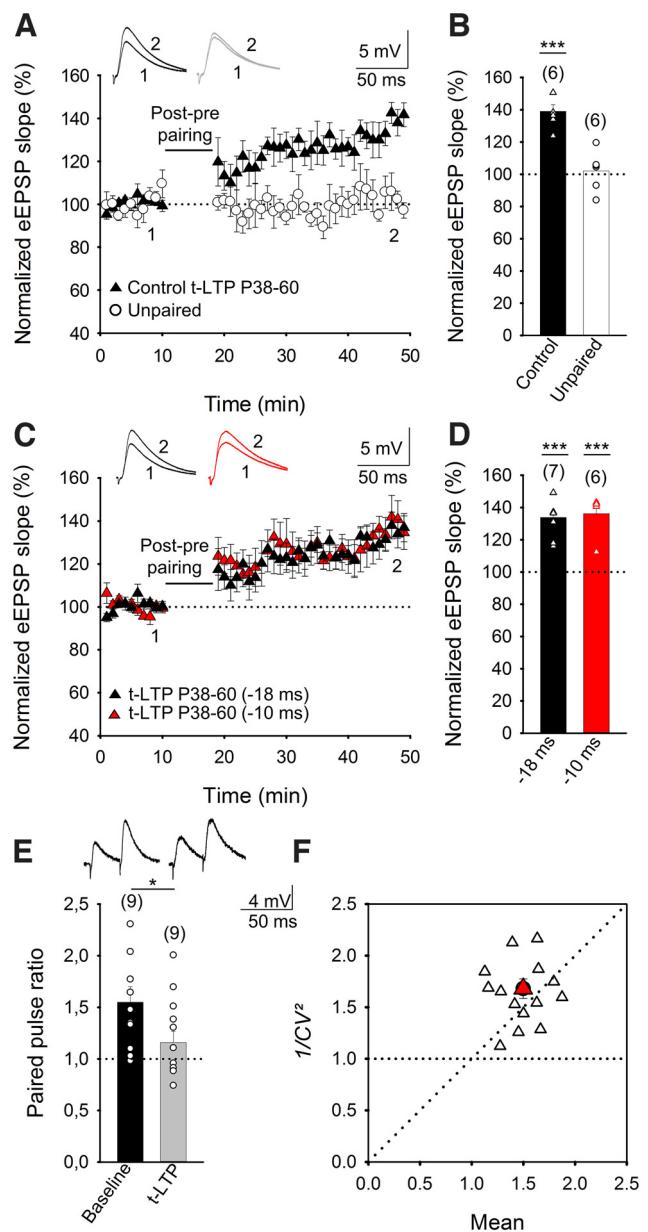


Figure 4. The presynaptic t-LTD at P13–27 in the somatosensory cortex switches to t-LTP at P38–60. **A**, A postprotocol/preprotocol induces t-LTP at P38–60. The EPSP slopes monitored in paired (black triangles) and unpaired pathways (white circles) are shown. The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) applying the induction protocol in the paired pathway, only the paired pathway showed t-LTP. **B**, Summary of the results. **C**, A postpairing before prepairing protocol at P38–60 induces t-LTP for $\Delta t = -18\text{ ms}$ (black triangles) and $\Delta t = -10\text{ ms}$ (red triangles). **D**, Summary of results. **E**, t-LTP induced by a postprotocol/preprotocol at P38–60 is expressed presynaptically. PPR decreases after t-LTP, sample traces at baseline and 30 min after the induction of t-LTP. **F**, A normalized plot of CV^2 versus mean EPSP slope yields data points mainly above the diagonal after induction of t-LTP. Error bars indicate SEM, and the number of slices is shown in parentheses. Mann–Whitney *U* test (**B**, **D**) and Wilcoxon signed-rank test (**E**, **F**); ****p* < 0.001, **p* < 0.05.

unpaired pathway; Fig. 4A,B). Hence, there appears to be a switch from t-LTD to t-LTP at L4–2/3 synapses of somatosensory cortex during development. To determine whether the switch occurred also with other time intervals between spikes, we performed experiments using a -10 ms gap. A switch to t-LTP was also observed at -10 ms (post-pre protocol $136 \pm 6\%$, $n = 6$; Fig. 4C,D) as occurred at -18 ms ($134 \pm 5\%$, $n = 7$; Fig. 4C,D), indicating the switch

from t-LTD to t-LTP is common to at least two different spike time intervals (-18 and -10 ms).

Presynaptic expression of t-LTP

Although t-LTD is known to be presynaptically expressed at S1 L4–L2/3 synapses (Bender et al., 2006; Nevian and Sakmann, 2006; Brasier and Feldman, 2008; Rodríguez-Moreno and Paulsen, 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2011; but see Carter and Jahr, 2016), we confirmed that here by analyzing the paired-pulse facilitation ratio and CV. First, we analyzed the PPRs at baseline and 30 min after the pairing protocol was applied, identifying a significant decrease in the PPR after t-LTP (from 1.55 ± 0.15 at baseline to 1.16 ± 0.11 , $n = 9$; Fig. 4E) that was indicative of a presynaptic change. Second, we estimated the noise-subtracted CV of the synaptic responses before and after t-LTP induction. A plot of CV^{-2} versus the change in the mean evoked EPSP slope (M) before and after t-LTP mainly yielded points above the diagonal line, consistent with a presynaptic modification of release parameters (Brock et al., 2020; Fig. 4F). Together, these data suggest an increase in the probability of neurotransmitter release in the paired pathway, and they are indicative of a presynaptic locus for this form of t-LTP.

Presynaptic t-LTP requires NMDARs and mGluRs

The t-LTD detected in juveniles (P13–27) requires NMDARs (Bender et al., 2006; Nevian and Sakmann, 2006; Brasier and Feldman, 2008; Rodríguez-Moreno and Paulsen, 2008; Banerjee et al., 2009, 2014; Rodríguez-Moreno et al., 2011), and, indeed, the presynaptic form of t-LTP that appears at P38–60 was prevented in the presence of D-AP5 ($50 \mu\text{M}$; $106 \pm 10\%$, $n = 7$) or MK-801 ($500 \mu\text{M}$; $87 \pm 7\%$, $n = 6$) relative to the interleaved controls ($141 \pm 5\%$, $n = 9$; Fig. 5A,B). Hence, the t-LTP induced by a post-pre protocol at P38–60 does require NMDARs. Because mGluRs have been implicated in plasticity and LTP in different regions and at distinct synapses (Anwyll, 2009), we tested whether the presynaptic t-LTP at L4–L2/3 synapses also required mGluRs. Indeed, t-LTP was completely blocked by exposure to the broad-spectrum mGluR antagonist LY341495 ($100 \mu\text{M}$, $94 \pm 10\%$, $n = 6$; Fig. 5C,D) and by treating the slices with the mGluR1 antagonist LY367385 ($100 \mu\text{M}$; $113 \pm 8\%$, $n = 7$), relative to interleaved slices for the two experimental conditions pooled together ($146 \pm 5\%$, $n = 7$; Fig. 5C,D), indicating this t-LTP required mGluR1s. To determine whether these mGluRs are postsynaptic, we repeated the experiments with the postsynaptic neuron loaded with GDP β S to prevent G-protein mediated signaling, a situation that prevented the induction of t-LTP ($101 \pm 10\%$, $n = 8$, vs $137 \pm 4\%$, $n = 7$, in interleaved control slices with no GDP β S loaded into the postsynaptic cells; Fig. 5E,F). Hence, mGluR1, possibly located in postsynaptic neurons, seems to be necessary for t-LTP induction.

Presynaptic t-LTP requires postsynaptic Ca^{2+} and NO

Both t-LTP and t-LTD appear to require postsynaptic Ca^{2+} at neocortical (Bender et al., 2006; Nevian and Sakmann, 2006; Rodríguez-Moreno et al., 2013) and hippocampal synapses (Andrade-Talavera et al., 2016; Falcón-Moya et al., 2020; Mateos-Aparicio and Rodríguez-Moreno, 2020), which led us to assess whether the presynaptic t-LTP at cortical L4–L2/3 synapses also requires postsynaptic Ca^{2+} . When we loaded the postsynaptic neuron with the calcium chelator BAPTA (20 mM), t-LTP was not induced ($101 \pm 6\%$, $n = 6$; Fig. 6A,B), demonstrating that postsynaptic calcium was

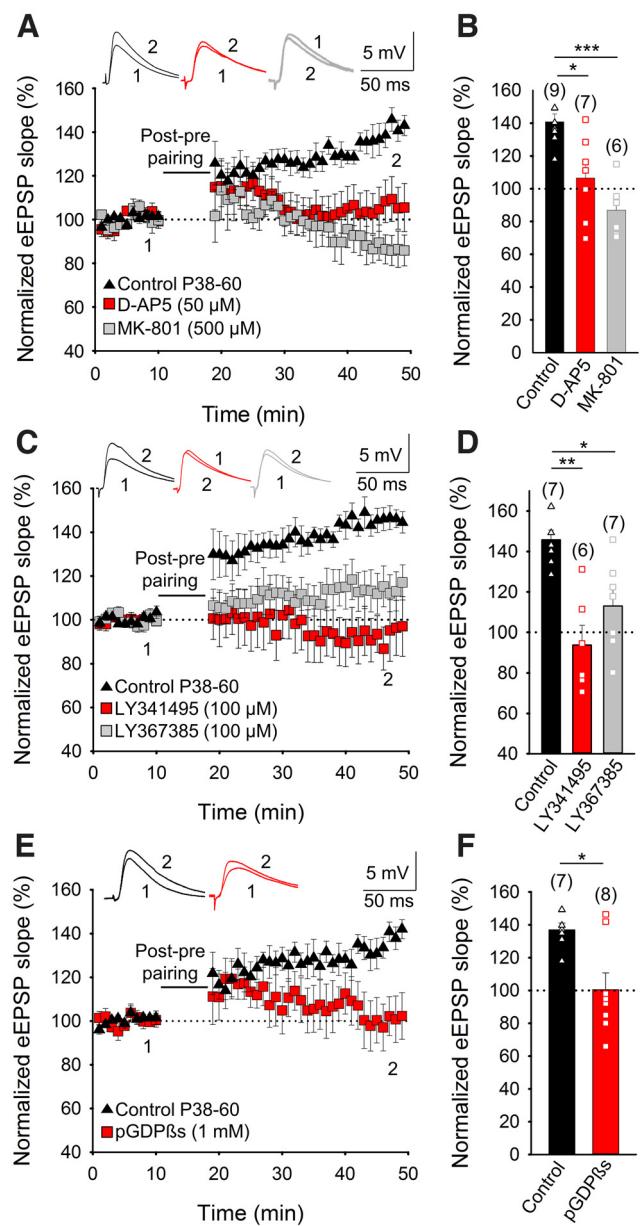


Figure 5. Presynaptic t-LTP requires NMDA and Group I mGluR1 metabotropic glutamate receptors. **A**, Addition of D-AP5 ($50 \mu\text{M}$) or MK-801 ($500 \mu\text{M}$) to the superfusion solution prevented t-LTP induction. The EPSP slope is shown in D-AP5-treated (red squares), MK-801-treated (gray squares), and untreated cells (black triangles). The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **B**, Summary of the results. **C**, The t-LTP requires mGluR. The EPSP slopes monitored in control slices (black triangles) and in slices treated with the mGluR antagonist LY341495 ($100 \mu\text{M}$, red squares) or the mGluR1 antagonist LY367385 ($100 \mu\text{M}$, gray squares) are shown following postpairing before prepairing. The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **D**, Summary of the results. **E**, The t-LTP requires activation of postsynaptic mGluRs. Time course of t-LTP induction in control conditions (black triangles) and with the postsynaptic neuron (red squares) loaded with GDP β S (1 mM). Inset, Traces show the EPSP before (1) and 30 min after pairing (2) in control slices or when the postsynaptic neurons are loaded with GDP β S. **F**, Summary of the results. Error bars indicate SEM, and the number of slices is shown in parentheses. Kruskal–Wallis test (**B**, **D**) and Mann–Whitney *U* (**F**); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

required for t-LTP. As L-type Ca^{2+} channels have been implicated in plasticity in the cortex (Bender et al., 2006; Nevian and Sakmann, 2006), we evaluated whether they were involved in t-LTP by performing the pairing protocol after bath application of the L-type Ca^{2+} channel blocker nimodipine ($10 \mu\text{M}$). In these conditions t-LTP was prevented

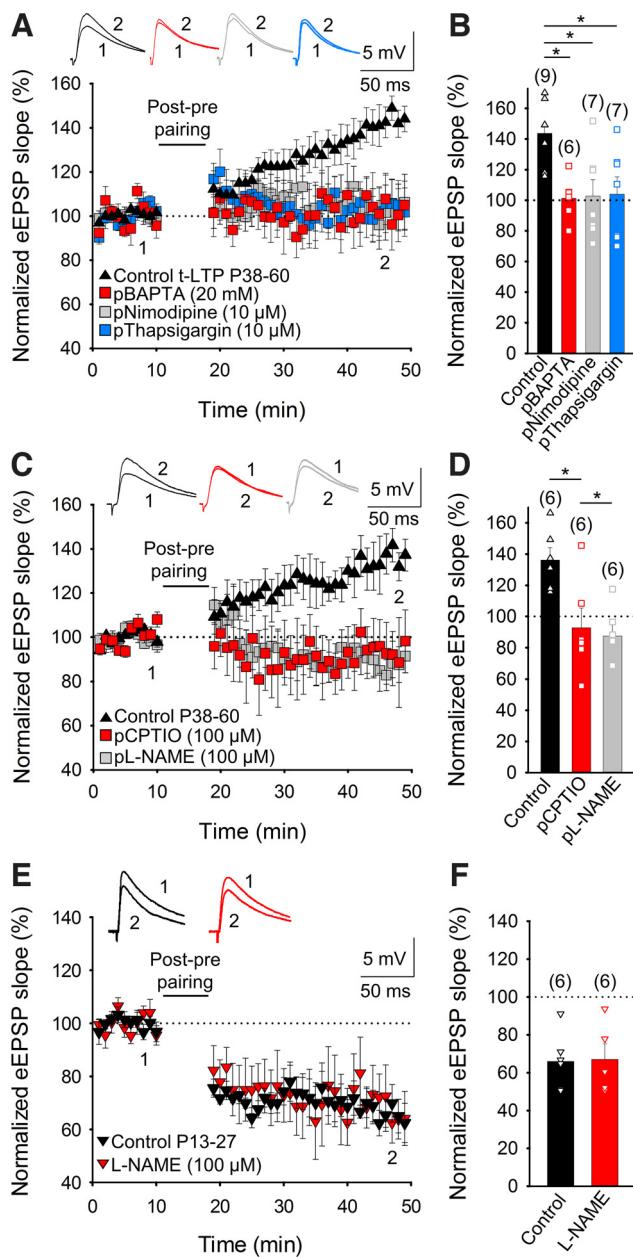


Figure 6. Postsynaptic calcium and NO are required for t-LTP. **A**, t-LTP is prevented by loading BAPTA (20 mM), nimodipine (10 μM), and thapsigargin (10 μM) into the postsynaptic recording pipette. The EPSP slopes shown were monitored in control slices (black triangles) and in slices treated with BAPTA (red squares), nimodipine (gray squares), or thapsigargin (blue squares). The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **B**, Summary of the results. **C**, Time course of the effect of postpairing before preparing in control conditions (black triangles) and loading cPTIO (100 μM, red squares) or L-NAME (100 μM, gray squares) into the postsynaptic neuron. Insets, The traces show the EPSPs before (1) and 30 min after pairing (2). **D**, Summary of the results. Error bars indicate SEM, and the number of slices is shown in parentheses. NO is not necessary for t-LTD at P13–P27. **E**, The EPSP slopes monitored in control conditions (black triangles) and in the presence of L-NAME (100 μM, red triangles) are shown. Traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing for each condition. **F**, Summary of the results. Error bars indicate SEM, and the number of slices is shown in parentheses. Kruskal–Wallis test, *p < 0.05.

(111 ± 7%, n = 7), as it was when nimodipine was loaded into the postsynaptic neuron (103 ± 10%, n = 7; Fig. 6A,B), indicating that like presynaptic t-LTD, this presynaptic t-LTP requires calcium flux through L-type calcium channels into the postsynaptic neuron. In addition, the release of Ca²⁺ from

intracellular stores is thought to be required for plasticity at cortical and hippocampal synapses (Bender et al., 2006; Nevian and Sakmann, 2006; Andrade-Talavera et al., 2016; Falcón-Moya et al., 2020). Indeed, when we assessed this possibility, t-LTP was prevented when the post-pre protocol was applied at P38–60 after depleting intracellular Ca²⁺ stores by loading the postsynaptic neuron with thapsigargin (10 μM; 104 ± 11%, n = 7, vs interleaved controls, 144 ± 6%, n = 9; Fig. 6A,B). Hence, Ca²⁺ release from intracellular stores is required for t-LTP.

It was recently demonstrated that NO from the postsynaptic neuron is necessary to induce presynaptic t-LTP in the hippocampus (Falcón-Moya et al., 2020). NO has been identified as a retrograde signal implicated in presynaptic LTP (Castillo, 2012; Pigott and Garthwaite, 2016; Padamsey et al., 2017), and there is evidence that calcium influx through L-type calcium channels could participate in NO synthesis and/or its release from postsynaptic neurons (Parpura and Zorec, 2010; Castillo, 2012). The induction of presynaptic t-LTP was prevented when the NO scavenger cPTIO (100 μM; 93 ± 12%, n = 6) or the NO synthase inhibitor L-NAME (100 μM; 87 ± 7%, n = 6) was loaded into the postsynaptic neuron, relative to the presynaptic t-LTP in interleaved controls (136 ± 8%, n = 6; Fig. 6C,D). Interestingly, L-NAME had no effect on t-LTD when added to the bath at P13–27 (67 ± 8%, n = 6, vs 66 ± 6%, n = 6, in interleaved controls; Fig. 6E,F). Together, these results indicate that NO produced and released by the postsynaptic neuron is required specifically for t-LTP.

Presynaptic t-LTP involves astrocytic signaling

Astrocytes are implicated in t-LTD at the synapses studied here (Min and Nevian, 2012; Rodríguez-Moreno et al., 2013), and they participate in closing the window of plasticity as the hippocampus matures. Thus, we assessed whether astrocyte activation is also necessary to induce the presynaptic form of t-LTP that appears after P38. When individual astrocytes in slices from P38–60 mice were loaded with the Ca²⁺ chelator BAPTA (20 mM) through the patch pipette to inhibit vesicle and Ca²⁺-dependent gliotransmitter release (Pascual et al., 2005), no t-LTP was observed at proximal (50–100 μm) L4–L2/3 synapses (105 ± 9%, n = 9; Fig. 7A,B). Moreover, this phenomenon was assessed in P38–60 dn-SNARE mutant mice in which vesicular gliotransmitter release is blocked (Pascual et al., 2005; Sardinha et al., 2017). In slices from dn-SNARE mice, the basal activity of L4–L2/3 synapses was slightly stronger (23 ± 8%, n = 7) because of the lack of ATP/adenosine tonic inhibition, and less intense stimulation was necessary to obtain the same amplitude EPSP as in slices from WT mice, as reported previously in other regions (Pascual et al., 2005; Sardinha et al., 2017). In these mutant mice, the typical t-LTP observed at P38–60 in WT L4–L2/3 synapses (148 ± 7%, n = 9) was not evident (83 ± 5%, n = 7; Fig. 7A,B). Together, these results indicate that astrocytes are required for t-LTP induction and for the switch from t-LTD to t-LTP.

Enhanced inhibition of presynaptic release mediated by the activation of A₁Rs is involved in t-LTP. Having demonstrated that presynaptic A₁R activation is responsible for the loss of t-LTD at P28–37, we found that the antagonist of A₁Rs (8-CPT) also fully impaired t-LTP (68 ± 6%, n = 6, vs 140 ± 3%, n = 6, in interleaved control slices; Fig. 7C,D). Although 8-CPT did not affect t-LTD at P13–27 (Fig. 2C,D), it did still recover the lost t-LTD at P28–37 (Fig. 2A,B). When the EPSP slope was measured in the presence of this A₁R antagonist, 8-CPT had a stronger effect at P28–37 than at P13–27 (Fig. 2E,F). If extracellular

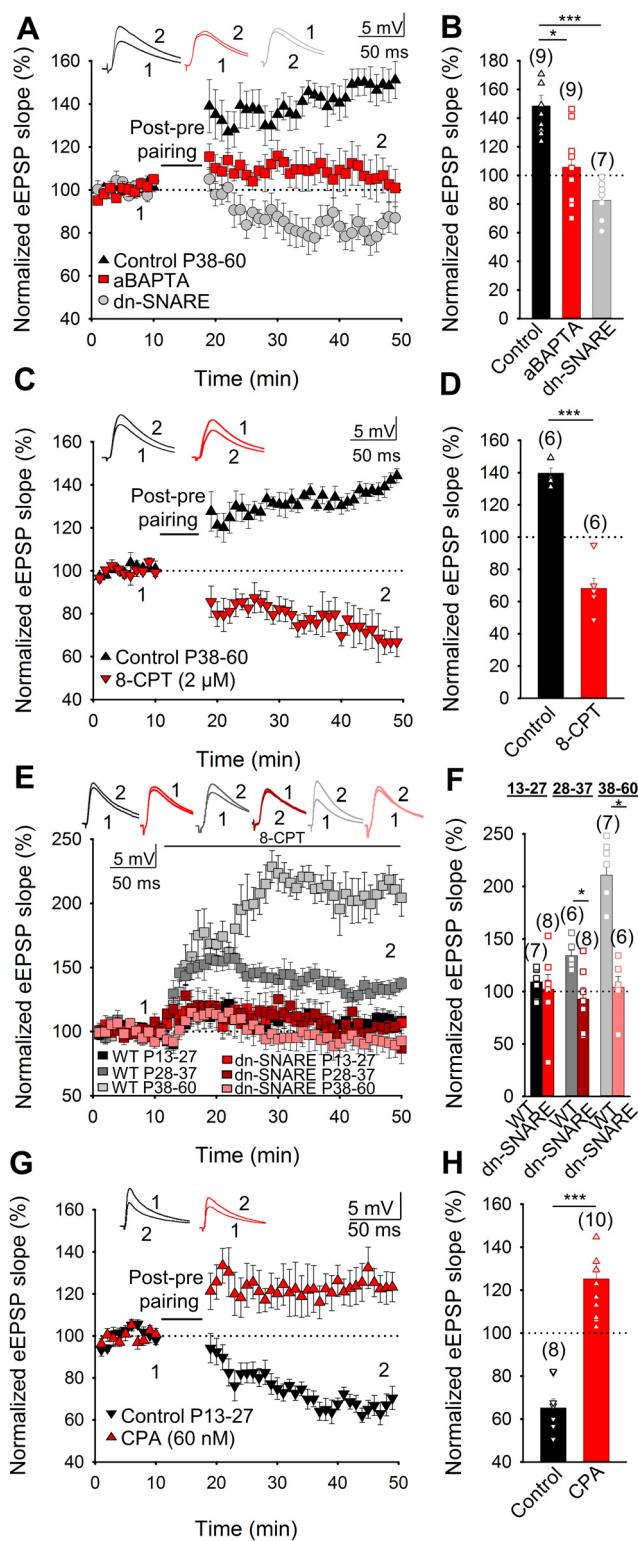


Figure 7. The involvement of astroglial adenosine in t-LTP. **A**, Astrocytes are required for t-LTP. Time course of t-LTP induction in control conditions (black triangles), and of the loss of t-LTP in BAPTA-treated astrocytes (20 mM, red squares) or in dn-SNARE mutant mice (gray circles). The traces show the EPSP before (1) and 30 min after pairing (2). **B**, Summary of the results. **C**, Time course of t-LTP induction in control conditions (black triangles) and of the loss of t-LTP in 8-CPT-treated slices (2 μ M, red triangles). The traces show the EPSP before (1) and 30 min after pairing (2). **D**, Summary of the results. **E**, 8-CPT increases the evoked EPSP slope at P13–27 (black squares), P28–37 (dark gray squares), and P38–60 (light gray squares) in WT but not in dn-SNARE mice (P13–27, red squares; P28–37, dark red squares; P38–60, light red squares). **F**, Summary of the results. **G**, An increase in presynaptic A₁R

adenosine levels continue to increase as development proceeds, a stronger effect on presynaptic A₁Rs would be expected at P38–60. Indeed, the EPSP slope increased more in the presence of 8-CPT at this later age (P38–60 218 \pm 10%, n = 7) than at P13–27 (117 \pm 4%, n = 7) or P28–37 (150 \pm 8%, n = 6; Fig. 7E,F). These results indicate that presynaptic A₁R mediated inhibition increases with maturation. We also studied the effect of 8-CPT in dn-SNARE mice to determine whether the ATP/adenosine that activates A₁Rs originates from astrocytes, and we found that 8-CPT had practically no effect on the EPSP slope in these mice at any of the ages studied (P13–27 115 \pm 6%, P28–37, n = 8; 112 \pm 9%, n = 8; and P38–60 115 \pm 12%, n = 6. Fig. 7E,F).

A₁R activation at P13–27 converts t-LTD into t-LTP. If extracellular adenosine concentrations increase during development and more strongly activate presynaptic A₁R at L4–L2/3 cortical synapses, dampening the glutamate release and mediating a switch from t-LTD to t-LTP at P38–60, it might be possible to convert t-LTD to t-LTP earlier in the development by enhancing A₁R activation (e.g., at P13–27 when t-LTD is robust or at P28–37 when t-LTD is lost). We previously demonstrated that CPA (30 nM) cannot convert t-LTD into t-LTP, but rather it prevents t-LTD induction at P13–27 (Fig. 2E,F). However, increasing the concentration of CPA to 60 nM converted t-LTD into t-LTP at P13–27 (from 65 \pm 4%, n = 8, to 125 \pm 7%, n = 10; Fig. 7G,H). These results were consistent with a primary involvement of A₁Rs in the switch from t-LTD to t-LTP associated with maturation, and they suggest that the adenosine activating A₁Rs might be released by astrocytes. As such, presynaptic adenosine activated presynaptic A₁Rs, an effect that was enhanced as the brain matures.

Adenosine and glutamate are required for t-LTP

It might be expected that if ATP/adenosine was the only gliotransmitter mediating the switch from t-LTD to t-LTP, the A₁R agonist CPA should be able to recover t-LTP at P38–60 in dn-SNARE mice when no t-LTP would otherwise be observed. However, t-LTP was not recovered by CPA in these conditions (105 \pm 8%, n = 6, vs 149 \pm 7%, n = 9, in control slices; Fig. 8A,B), suggesting that another gliotransmitter released by astrocytes or just after astrocyte activation might also be involved. We tested whether glutamate may also be required to induce presynaptic t-LTP at P38–60 by applying glutamate puffs. When we tested this in slices from dn-SNARE mice maintained in the presence of CPA, the glutamate puffs applied partially recovered the t-LTP (122 \pm 6%, n = 6; Fig. 8A,B), indicating that the ATP/adenosine and glutamate, probably released as gliotransmitters by astrocytes, seem to be necessary for the induction of presynaptic t-LTP.

Finally, to define the signal that might stimulate astrocytes to release gliotransmitters and mediate this form of LTP, we evaluated the role of NO, the release of which from the postsynaptic neuron is necessary for t-LTP. NO was previously shown to increase the calcium that enters and stimulates astrocytes (Matyash et al., 2001), raising the possibility that NO could

←

mediated inhibition converts t-LTD at P13–27 in t-LTP. When A₁Rs are activated by CPA (60 nM) at P13–27, a post-pre protocol induced t-LTP. The EPSP slopes monitored in the control condition (black triangles) and in the presence of bath-applied CPA (red triangles) are shown. The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **H**, Summary of results. Error bars indicate SEM, and the number of slices is shown in parentheses. Kruskal–Wallis test (**B**) and Mann–Whitney test (**D**, **F**, **H**); * p < 0.05, *** p < 0.001.

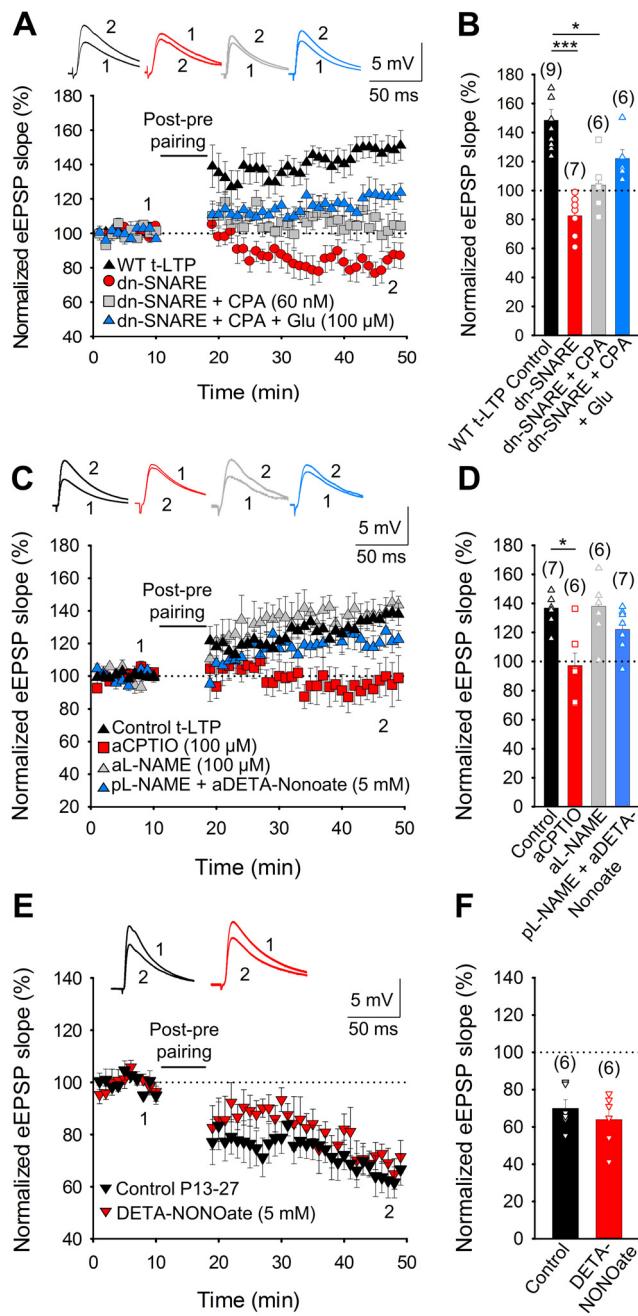


Figure 8. Astroglial glutamate involvement in t-LTP. **A**, The release of glutamate and adenosine by astrocytes is necessary for presynaptic t-LTP induction. Time course of the effect of postpairing before preparing in control conditions (black triangles), in dn-SNARE slices (red circles), in slices from dn-SNARE mice exposed to CPA (60 nM, gray squares), or in slices from dn-SNARE mice exposed to CPA and glutamate puffs (100 μM, blue triangles). Insets, The traces show the EPSPs before (1) and 30 min after pairing (2). **B**, Summary of the results. NO is necessary for astrocyte release of gliotransmitter(s) and t-LTP induction. **C**, t-LTP is prevented by loading CPTIO (100 μM) into the astrocyte via the recording pipette but not by loading L-NAME (100 μM). When L-NAME is loaded into the postsynaptic neuron and NO donor (DETA-NONOate, 5 mM) added in forms of puffs over astrocytes, t-LTP is partially recovered. The EPSP slopes monitored are shown in paired control slices (black triangles) and in slices treated with aCPTIO (red squares), aL-NAME (gray triangles) and pL-NAME + DETA-NONOate (blue triangles). The traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **D**, Summary of the results. Error bars indicate SEM, and the number of slices is shown in parentheses. The NO donor, DETA-NONOate, does not affect t-LTD at P13–27. **E**, The EPSP slopes monitored in control conditions (black triangles) and in slices exposed to DETA-NONOate (5 mM, red triangles) are shown. Traces show the EPSP before (1) and 30 min after (2) pairing. **F**, Summary of the results. Error bars indicate SEM, and the number of slices is shown in parentheses. Kruskal–Wallis test (**B**, **D**); *p < 0.05, ***p < 0.001.

activate or interact with astrocytes to release ATP/adenosine and/or glutamate in our conditions. Interestingly, t-LTP induction was prevented by loading astrocytes with the NO scavenger cPTIO (96 ± 10%, n = 6) but not when they were loaded with L-NAME (aL-NAME 135 ± 9%, n = 6, vs untreated control slices 137 ± 4%, n = 7; Fig. 8C,D). In addition, when t-LTP induction was prevented by loading the postsynaptic neuron with L-NAME, puffs of the NO donor DETA-NONOate (5 mM) on astrocytes recovered t-LTP (122 ± 6%, n = 6; Fig. 8C,D), although DETA-NONOate did not affect t-LTD at P13–27 (DETA-NONOate 64 ± 6%, n = 6, vs untreated control slices 70 ± 5%, n = 6; Fig. 8E,F). Hence, the NO that participated in this form of t-LTP was not synthesized by astrocytes, but rather it originated in the postsynaptic neuron.

Discussion

Loss of t-LTD by the end of the fourth week of postnatal development

Using a postprotocol/preprotocol, with a –18 ms gap between the presynaptic and postsynaptic activity, presynaptically expressed t-LTD was observed at L4–2/3 synapses from P13 to 27 (Fig. 9A) that disappears at ~P27, as detected previously (Banerjee et al., 2009). This is also consistent with previous studies showing that the capacity for synaptic depression at cortical synapses and in the hippocampus declines with age (Bear and Abraham, 1996; Corlew et al., 2007; Banerjee et al., 2009; Rodríguez-Moreno et al., 2013; Andrade-Talavera et al., 2016; Pérez-Rodríguez et al., 2019). There was a loss of t-LTD with two additional time gaps between presynaptic and postsynaptic activity to induce t-LTD (–25 and –10 ms), with t-LTD disappearing at P28–37. We did not check other intervals but these results are indicative that a shift in the time windows does not mediate the loss of t-LTD associated with maturation. These results extend the developmental loss of t-LTD observed in other brain regions like the visual cortex and hippocampus to the somatosensory cortex. Whether this a general phenomenon requires studying other brain regions and synapses.

Adenosine A₁ type receptors mediate the enhanced inhibition that is responsible for the loss of plasticity during development

We show that enhanced inhibition is required to close the window of plasticity. This enhanced inhibition is not mediated by GABA_A receptor activation, as in the visual cortex (Hensch, 2004, 2005) where astrocytes were recently implicated in closing the critical period of plasticity (Ribot et al., 2021). Likewise, GABA_B receptors do not appear to be involved in this shift (this study) because the loss of t-LTD at the end of the fourth week of development is not affected by the presence of GABA_A or GABA_B receptor antagonists. However, t-LTD does not disappear during development in the presence of an A₁R antagonist, a clear indication of the crucial role of adenosine in t-LTD. Indeed, activating A₁Rs at P13–27 when a robust t-LTD can be induced, the window of plasticity closed prematurely, and there was a loss of t-LTD similar to that observed in older mice (P27–38). This mechanism is similar to that observed recently in the hippocampus (Falcón-Moya, 2020), suggesting the two structures use a similar mechanism to close a window of plasticity. It will be of interest to study these mechanisms in other brain structures and synapses to confirm whether this a general mechanism in the brain.

Presynaptic A₁R activation produces a decrease in glutamate release, the most probably explanation for the loss of t-LTD

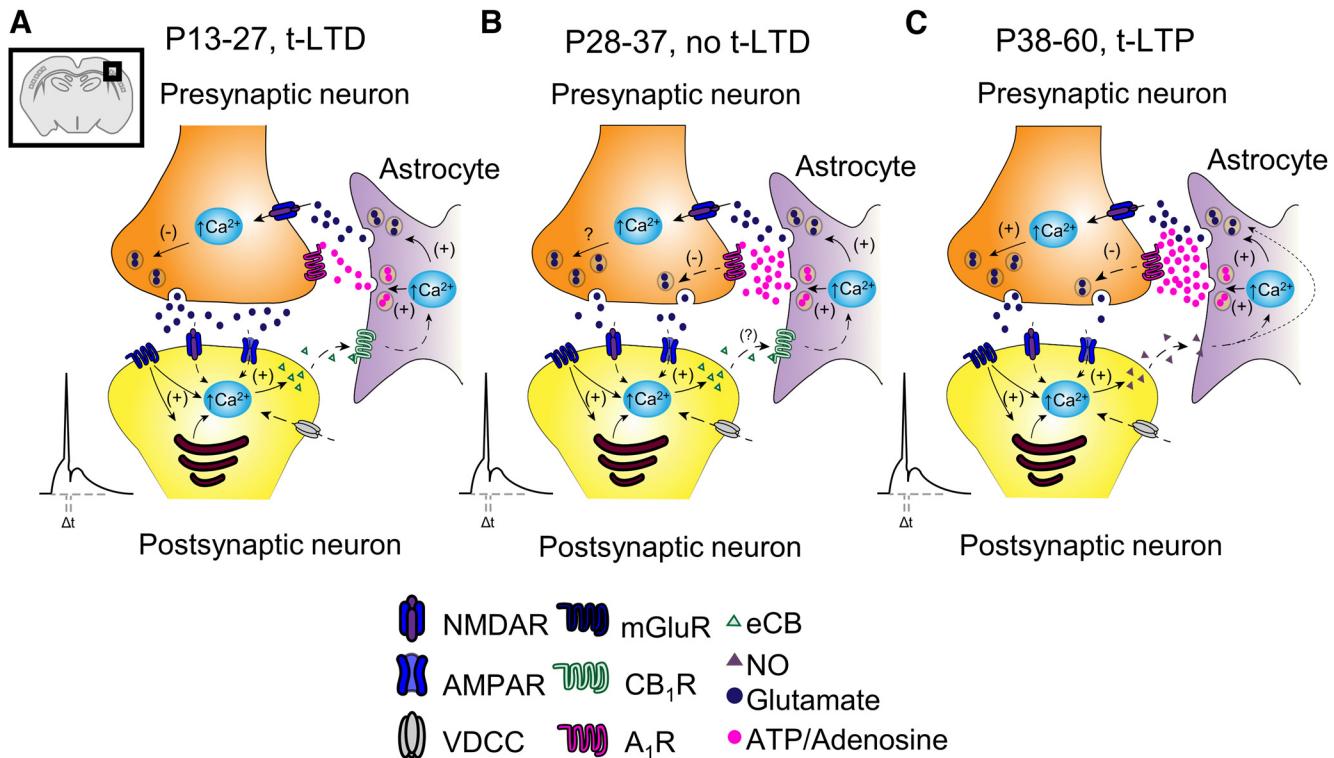


Figure 9. Scheme of the differences in signaling between early (P13–27), juvenile (P28–37), and adult (P38–60) stages of development at L4–L2/3 synapses of the somatosensory cortex. **A, B,** At P13–27, a known presynaptic form of t-LTD is induced by a post- pre-single-spike-pairing protocol. In this presynaptically expressed form of t-LTD, postsynaptic action potentials activate voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs), and the presynaptically released glutamate activates postsynaptic mGluR, provoking Ca^{2+} release from internal stores and eCB synthesis. For t-LTD, eCB is necessary to activate CB₁ receptors and to facilitate glutamate release from astrocytes. Together with the glutamate released from presynaptic neurons, this glutamate is known to activate preNMDARs on L4 boutons, leading to an increase in presynaptic Ca^{2+} and synaptic depression (Bender et al., 2006; Rodriguez-Moreno and Paulsen, 2008; Min and Nevian, 2012). In the present study, we show that t-LTD does not develop at P28–37 (**B**) and that the main difference with regard to P13–27 is an increase in adenosine release from astrocytes at this stage of development. **C,** At P38–60 t-LTD is not only lost, but it switches to a presynaptic form of t-LTP. For the induction of this presynaptic form of t-LTP, postsynaptic action potentials activate VDCCs, inducing calcium release from internal stores and NO synthesis. The NO activates astrocytes and provokes the release of glutamate and/or adenosine, which in turn stimulates NMDARs and A₁R on L4 boutons, respectively. A₁R activation considerably dampens the probability of neurotransmitter release, whereas NMDAR activation produces a long-lasting increase in glutamate release and synaptic potentiation.

(Dunwiddie and Masino, 2001). Here, we used two different approaches to determine whether adenosine acts on A₁Rs, PPR, and fluctuation analysis, both of which were consistent with the presynaptic activity of A₁Rs. As observed in the hippocampus (Sebastião et al., 2000; Rex et al., 2005; Kerr et al., 2013; Falcón-Moya, 2020), the concentration of adenosine at S1 L4–L2/3 synapses seems to increase with maturation as a stronger increase in the EPSP slope was induced by 8-CPT at P28–37 than at P13–27. Thus, like CA3–CA1 synapses in the hippocampus, it seems that the activation of presynaptic A₁Rs augments during development because of the increase in extracellular adenosine. This activation inhibits glutamate release, reducing the ambient glutamate and possibly dampening the NMDAR activity necessary for t-LTD, causing its loss. Hence, the increase in adenosine seems to affect glutamate release and t-LTD (Fig. 9B).

Adenosine released as a result of astrocyte signaling is required for the loss of plasticity during development

It is of interest to identify the specific source of adenosine as there are many possibilities. It may be released from neurons by exocytosis (Klyuch et al., 2012) or via transporters (Lovatt et al., 2012), indirectly through the extracellular metabolism of the ATP exocytosed by neurons (Jo and Schlichter, 1999) or glial cells (Pascual et al., 2005), or through glial gap junction hemi-channels (Huckstepp et al., 2010). Indeed, these mechanisms may also operate concomitantly. We assessed whether

astrocytes are needed to produce the adenosine that activates A₁Rs as they are a well-known potential source of adenosine (mostly in the form of its precursor, ATP) and other gliotransmitters, released after calcium mobilization of astrocytic vesicles (Araque et al., 2014). At P28–37, preventing vesicle release by loading astrocytes with BAPTA recovers t-LTD, an effect that was blocked by CPA, demonstrating that adenosine released by astrocytes or as a result of astrocyte signaling is required for the loss of t-LTD. Although only one astrocyte was loaded with BAPTA, the effect on plasticity observed is most probably because of the activation of a network of astrocytes, as the single cell loaded is connected to others through gap junctions (Mederos et al., 2018). We also demonstrate that directly stimulating astrocytes increases the extracellular adenosine sufficiently to affect the EPSP slope, thereby affecting glutamate release. Whether the increase in extracellular adenosine observed with maturation (here and previously in the hippocampus) is produced by an increase in the number of astrocytes or by enhanced release requires further study. Our results indicate that t-LTD is present at L4–L2/3 synapses of the mouse somatosensory cortex until the end of the fourth week of development. The disappearance of this form of t-LTD is because of inhibition mediated by the activation of presynaptic A₁Rs during maturation. The involvement of adenosine in closing windows of plasticity is emerging as a common regulatory event given that it has also been seen in

the hippocampus (Pérez-Rodríguez et al., 2019), and adenosine has been seen to be able to recover plasticity at a systems level in the adult auditory cortex (Blundon et al., 2017).

A switch from t-LTD to t-LTP occurs at P38–60

In the second part of this study, we show that presynaptic t-LTD switches to presynaptic t-LTP at somatosensory L4–L2/3 synapses as young mice mature, demonstrating that this form of t-LTP is expressed presynaptically and that it requires mGluR1 and NMDAR activation. In addition, this presynaptic t-LTP requires the flux of calcium through postsynaptic L-type calcium channels, as well as calcium release from postsynaptic intracellular stores and postsynaptic NO release. The latter acts as a retrograde signal that mediates the astroglial release of ATP/adenosine to activate presynaptic A₁R s and that of glutamate to presumably activate NMDARs (Fig. 9C). We present evidence from two approaches to determine the locus of this form of t-LTP, PPRs and CV, both consistent with presynaptic changes. Hence, this presynaptically expressed LTP appears during development through a switch from t-LTD such that our findings expand the repertoire of presynaptic LTPs to this type at S1 L4–L2/3 synapses. Studying the timing dependency of this form of t-LTP, the switch from t-LTD to t-LTP occurred at different time intervals, –18 and –10 ms, where there was robust t-LTD at P13–27. Hence, this switch would appear to arise on maturation, and it is most probably not because of a broadening of the time interval or a shift along the time axis, although it is possible that the switch does not happen at time intervals not tested. A relevant question that needs to be addressed is whether this switch from t-LTD to t-LTP is observed only with STDP or if it is also present when other protocols are used that induce LTD in young animals. It is noteworthy that STDP has been suggested to depend on the extracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_e$) in the hippocampus, where at $[Ca^{2+}]_e$ considered to be physiological (1.3–1.8 mM) t-LTD plasticity alone was impaired (Inglebert et al., 2020). In the somatosensory cortex studied, the $[Ca^{2+}]_e$ is slightly higher than the indicated interval (2 mM), and, interestingly, both t-LTD and the switch to t-LTP occur in the presence of 1.5 mM or 2 mM $[Ca^{2+}]_e$, suggesting that both effects will be produced under physiological Ca^{2+} concentrations. This is also consistent with the fact that t-LTD at somatosensory cortex L4–L2/3 synapses has been witnessed *in vivo* in young mice (González-Rueda et al., 2018). Thus, it would be particularly interesting to determine whether this switch from t-LTD to t-LTP occurs *in vivo*.

Presynaptic t-LTP requires NMDAR and mGluR1

Regarding the receptor systems necessary for presynaptic t-LTP to appear as the animal matures, some clear differences were found between the hippocampus and somatosensory cortex. Although both types of t-LTP are presynaptically expressed, t-LTP requires NMDARs at L4–L2/3 synapses but not in the hippocampus. This is an interesting difference as a decrease in the number of presynaptic NMDARs has been found in the visual cortex with maturation (Corlew, 2007) and hippocampus (Pérez-Rodríguez et al., 2019). Although a possible switch from presynaptic t-LTD to presynaptic t-LTP has not yet been described in the visual cortex, it is associated with a lack of presynaptic NMDAR activity in the hippocampus. This probably indicates that the number of NMDARs is too low, and they cannot therefore participate in t-LTP, with mGluR5 participating instead (Pérez-Rodríguez et al., 2019; Falcón-Moya et al., 2020). Future experiments will determine

whether changes in the number of preNMDARs also occurs at S1 L4–L2/3 synapses with maturation. It is also possible that there is a different time course for hippocampal and cortical maturation, as indicated for the visual and somatosensory cortices (Cheetham and Fox, 2010). Another possible explanation for these regional differences is that the increased A₁R activation in the hippocampus with maturation dampens the probability of glutamate release such that insufficient glutamate is released and it fails to activate preNMDARs; yet in conjunction with glutamate released by astrocytes it reaches a level capable of activating the presynaptic mGluRs required for t-LTP but not preNMDARs. Here, we describe a similar mechanism at L4–L2/3 synapses, whereby presynaptic A₁R activation dampens glutamate release, although the amount released together with the glutamate released by astrocytes is still capable of activating mGluRs and probably, preNMDARs. However, more experiments are clearly necessary to clarify the events underlying these changes. In the hippocampus, presynaptic mGluR5 is required for presynaptic t-LTP (Falcón-Moya et al., 2020), where these receptors modulate glutamate release (Rodríguez-Moreno et al., 1998) and plasticity (Gómez-Gonzalo et al., 2015). Here, and unlike the hippocampus, we found that postsynaptic mGlu1R is likely to be necessary for the presynaptically expressed t-LTP found at S1 L4–L2/3 synapses. A maturation-associated shift from the involvement of NMDARs to mGluRs in plasticity was previously found in the hippocampus (Falcón-Moya et al., 2020). Although the same was not found here at cortical S1 L4–L2/3 synapses, where NMDARs mGluRs are involved in LTP.

What is clear from our results is that we have detected a new form of presynaptic LTP, expanding the existence of presynaptic forms of LTP to the somatosensory cortex. Forms of preLTP that are dependent on NMDARs have been described in the hippocampus (McGuinness et al., 2010) and at entorhinal cortex to DG synapses (Min et al., 1998; Jourdain et al., 2007; Pérez-Otaño and Rodríguez-Moreno, 2019; Savtchouk et al., 2019), and preLTP forms independent of NMDARs have also been described at hippocampal mossy fiber (MF)-CA3 synapses (Nicoll and Schmitz, 2005), as well as in the cerebellum (Salin et al., 1996), thalamus (Castro-Alamancos and Calcagnotto, 1999), subiculum (Behr et al., 2009), amygdala (López de Armentia and Sah, 2007), and neocortex (Chen et al., 2009). Although mGluRs were thought to be required for some forms of preLTP in the hippocampus (Perea and Araque, 2007; Gómez-Gonzalo et al., 2015), such preLTP was not induced using STDP protocols.

The somatosensory t-LTP requires postsynaptic calcium and NO
As with other forms of LTP, including t-LTP in the hippocampus, t-LTP requires a rise in Ca^{2+} in the postsynaptic cell and the release of Ca^{2+} from intracellular stores (Castillo, 2012; Padamsey and Emptage, 2014; Padamsey et al., 2017; Falcón-Moya et al., 2020; Mateos-Aparicio and Rodríguez-Moreno, 2020). These features of cortical t-LTP are also common to other forms of preLTP (Matyash et al., 2001; Navarrete et al., 2014), and postsynaptic mGluRs are known to recruit postsynaptic calcium stores. We found NO to be the retrograde signal produced by the postsynaptic neuron via Ca^{2+} increase as in other types of preLTP (Castillo, 2012; Padamsey and Emptage, 2014; Padamsey et al., 2017; Falcón-Moya et al., 2020; Mateos-Aparicio and Rodríguez-Moreno, 2020). t-LTP was prevented with aCPTIO but not when L-NAME was loaded into astrocytes. Hence, we concluded that the NO that

participates in this form of t-LTP is not synthetized by astrocytes but rather is released by the postsynaptic neuron and it seems to enter astrocytes to stimulate or modulate the release of gliotransmitters.

Presynaptic t-LTP requires astrocyte signaling

Through two different approaches we demonstrated the involvement of astrocytes in presynaptic t-LTP. First, introducing BAPTA into astrocytes completely prevented t-LTP induction. Second, vesicular release is impaired in dn-SNARE mice, and t-LTP is not observed in slices from these animals. Astrocytes have previously been shown to participate in synaptic potentiation (Jourdain et al., 2007; Perea and Araque, 2007; Savtchouk et al., 2019), yet not as the result of a switch from preLTD to preLTP as we show here at S1 L4–L2/3 synapses. We found that enhanced inhibition of presynaptic release as a result of adenosine activating presynaptic A₁Rs is responsible for the switch from t-LTD to t-LTP during the sixth week of development. Interestingly, A₁R activation at P13–27 converts t-LTD into t-LTP, confirming the importance of adenosine and presynaptic A₁Rs in the switch in plasticity observed, as also found recently in the hippocampus (Falcón-Moya et al., 2020). As found in the hippocampus (Falcón-Moya et al., 2020), our data suggest that adenosine is probably of astrocytic origin. However, as indicated for the loss of t-LTD, although astrocytes clearly participate in this event by probably releasing adenosine, there may also be other sources of this nucleoside (Manzoni et al., 1994). The increase in extracellular adenosine as the barrel cortex matures might be because of increased numbers of astrocytes or to enhanced release, which remains to be defined. As indicated, it may be possible to control plasticity by manipulating the availability of adenosine (Chun et al., 2013; Blundon et al., 2017), and thus adenosine might be an interesting target to improve health, learning, and memory.

Interestingly, and similar to what was found in the hippocampus, adenosine is not the only gliotransmitter necessary for the induction of t-LTP, with ATP/adenosine and glutamate required to mediate t-LTP induction. It is already known that individual astrocytes may release both adenosine and glutamate (Covelo and Araque, 2018), and in this way astrocytes may control basal synaptic activity (Panatier et al., 2011; Falcón-Moya et al., 2020) and tonically depress neurotransmission (Pascual et al., 2005), probably depressing some synapses and potentiating others (Covelo and Araque, 2018). In addition, it is possible that glutamate from the presynaptic neuron also activates preNMDARs but that this amount of glutamate or NMDAR activation is insufficient to drive t-LTP and that glutamate released from astrocytes is also required for t-LTP. It will be interesting to explore what the exact role of the postsynaptic neuron is in the induction of t-LTP and the role of mGluR1. As for the hippocampus, more research is needed to address this question, but surprisingly NO synthesized by the postsynaptic neuron seems to be released and enter the astrocyte, possibly stimulating gliotransmitter release by enhancing the calcium flux into the astrocyte (Matyash, 2001).

At present, it remains unclear what the physiological role of these progressive changes is in plasticity during development that seem to be mainly controlled by the amount of adenosine released by astrocytes at different stages of maturation. Indeed, further studies will be necessary to determine the true influence of STDP in the barrel cortex and the specific developmental role of t-LTD and t-LTP in these circuits. As discussed previously (Pérez-Rodríguez et al., 2019; Falcón-Moya et al., 2020), t-LTD

most probably participates in refining synapses, potentially weakening excitatory synapses that are underused or behaviorally irrelevant (Buonomano and Merzenich, 1998; Feldman and Brecht, 2005). The form of presynaptic t-LTP described here is present from the sixth week of development, indicating its relevance from early adulthood onward, when it probably influences learning and memory or other cognitive processes. Presynaptic plasticity may also involve structural changes and may change the short-term properties of neurotransmitter release, participating in circuit computations and changing the excitatory/inhibitory balance or sensory adaptations (Monday et al., 2018). Why some synapses, like L4–L2/3 synapses (and as observed in the hippocampus), show presynaptic and/or postsynaptic plasticity requires further study. Interestingly, STDP of L4–L2/3 and L2/3–L2/3 synapses in the somatosensory cortex has different requirements, indicating that the presynaptic or postsynaptic expression of plasticity is fundamental for the correct functioning of brain circuits and that it is possible they are regulated differently (Banerjee et al., 2009, 2014). Also, and as indicated by some computational models (Costa et al., 2017), presynaptically expressed t-LTP may increase the trial-to-trial reliability, and along with the postsynaptically expressed t-LTP, it may induce a larger change in signal-to-noise ratio than postsynaptic changes alone, as described in auditory cortex (Froemke et al., 2013). In addition, different sites of expression may be an advantage to the system as it may offer more possibilities for plasticity when one is disrupted.

Finally, it may be possible to associate particular behaviors with a particular locus of plasticity. The potential behavioral influence of presynaptic LTP is still an emerging issue for which the data available come from hippocampal MF-CA3 synapses, where preLTP is implicated in learning and memory (Hagena and Manahan-Vaughan, 2011), and from amygdala synapses, where preLTP is implicated in fear memory formation (Tovote et al., 2015). At L4–L2/3 synapses, the behavioral role of presynaptic t-LTP essentially remains to be determined. In the hippocampus, it has been suggested that at CA3–CA1 synapses, preLTP might be associated with learning and memory *in vivo* (Choi et al., 2018). Thus, determining how astrocytes control windows of plasticity by modulating the release of adenosine and other gliotransmitters to refine synapses *in vivo*, and learning and memory, will be of particular interest in the near future. For the moment, from the results described here, it is clear that astrocyte physiology determines, and may significantly affect, the time course of plasticity during development, and as such, it may be possible to open and close windows of plasticity in the somatosensory cortex through pharmacological manipulations.

References

- Agmon A, Connors BW (1991) Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex *in vitro*. *Neuroscience* 41:365–379.
- Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Paulsen O, Rodríguez-Moreno A (2016) Presynaptic spike timing-dependent long-term depression in the mouse hippocampus. *Cereb Cortex* 26:3637–3654.
- Anwyl R (2009) Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology* 56:735–740.
- Arai A, Kessler M, Lynch G (1990) The effects of adenosine on the development of long-term potentiation. *Neurosci Lett* 119:41–44.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728–739.
- Banerjee A, Meredith RM, Rodríguez-Moreno A, Mierau SB, Auberson YP, Paulsen O (2009) Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunit-preferring NMDA receptors antagonists in mouse barrel cortex. *Cereb Cortex* 19:2959–2969.

- Banerjee A, González-Rueda A, Sampaio-Baptista C, Paulsen O, Rodríguez-Moreno A (2014) Distinct mechanisms of spike timing-dependent LTD at vertical and horizontal inputs onto L2/3 pyramidal neurons in mouse barrel cortex. *Physiol Rep* 2:e00271.
- Banks MI, Hardie JB, Pearce RA (2002) Development of GABA(A) receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in hippocampus. *J Neurophysiol* 88:3097–3107.
- Bear MF, Abraham WC (1996) Long-term depression in hippocampus. *Annu Rev Neurosci* 19:437–462.
- Behr J, Wozny C, Fidzinski P, Schmitz D (2009) Synaptic plasticity in the subiculum. *Prog Neurobiol* 89:334–342.
- Bender VA, Bender KJ, Brasier DJ, Feldman DE (2006) Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J Neurosci* 26:4166–4177.
- Bi GQ, Poo MM (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci* 18:10464–10472.
- Bliss TV, Collingridge GL, Morris RG (2014) Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20130129.
- Blundon JA, Roy NC, Teubner BJW, Yu J, Eom TY, Sample KJ, Pani A, Smeyne RJ, Han SB, Kerekes RA, Rose DC, Hackett TA, Vuppala PK, Freeman BB 3rd, Zakharenko SS (2017) Restoring auditory cortex plasticity in adult mice by restricting thalamic adenosine signaling. *Science* 356:1352–1356.
- Bouvier G, Larsen RS, Rodríguez-Moreno A, Paulsen O, Sjöström PJ (2018) Towards resolving the presynaptic NMDA receptor debate. *Curr Opin Neurobiol* 51:1–7.
- Brasier DJ, Feldman DE (2008) Synapse-specific expression of functional presynaptic NMDA receptors in rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 28:2199–2211.
- Brock JA, Thomazeau A, Watanabe A, Li SSY, Sjöström PJA (2020) A practical guide to using CV analysis for determining the locus of synaptic plasticity. *Front Synaptic Neurosci* 12:11.
- Brzsko Z, Mierau SB, Paulsen O (2019) Neuromodulation of spike-timing-dependent plasticity: past, present and future. *Neuron* 103:563–581.
- Buonomano DV, Merzenich MM (1998) Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu Rev Neurosci* 21:149–186.
- Carter BC, Jahr CE (2016) Postsynaptic, not presynaptic NMDA receptors are required for spike-timing-dependent LTD induction. *Nat Neurosci* 19:1218–1224.
- Castillo PE (2012) Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005728–a005728.
- Castro-Alamancos MA, Calcagnotto ME (1999) Presynaptic long-term potentiation in corticothalamic synapses. *J Neurosci* 19:9090–9097.
- Cheetham CEJ, Fox K (2010) Presynaptic development at L4 to L2/3 excitatory synapses follows different time courses in visual and somatosensory cortex. *J Neurosci* 30:12566–12571.
- Chen HX, Jiang M, Akakin D, Roper SN (2009) Long-term potentiation of excitatory synapses on neocortical somatostatin-expressing interneurons. *J Neurophysiol* 102:3251–3259.
- Choi JH, Sim SE, Kim JI, Choi DI, Oh J, Ye S, Lee J, Kim T, Ko HG, Lim CS, Kaang BK (2018) Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation. *Science* 360:430–435.
- Chun S, Bayazitov IT, Blundon JA, Zakharenko SS (2013) Thalamocortical long-term potentiation becomes gated after the early critical period in the auditory cortex. *J Neurosci* 33:7345–7357.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18–41.
- Corlew R, Wang Y, Ghermanzien H, Erisir A, Philpot BD (2007) Developmental switch in the contribution of presynaptic and postsynaptic NMDA receptors to long-term depression. *J Neurosci* 27:9835–9845.
- Corlew R, Brasier DJ, Feldman DE, Philpot BD (2008) Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *Neuroscientist* 14:609–625.
- Costa RP, Mizusaki BE, Sjöström PJ, van Rossum MC (2017) Functional consequences of pre- and postsynaptic expression of synaptic plasticity. *Phil Trans R Soc B* 372:20160153.
- Covelo A, Araque A (2018) Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *Elife* 7:e32237.
- de Mendonça A, Ribeiro JA (1994) Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience* 62:385–390.
- Debanne D, Gähwiler BH, Thompson SM (1994) Asynchronous pre- and postsynaptic activity induces associative long-term depression in area CA1 of the rat hippocampus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1148–1152.
- Debanne D, Gähwiler BH, Thompson SM (1998) Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J Physiol* 507:237–247.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31–55.
- Falcón-Moya R, Pérez-Rodríguez M, Prius-Mengual J, Andrade-Talavera Y, Arroyo-García LE, Pérez-Artés R, Mateos-Aparicio P, Guerra-Gomes S, Oliveira JF, Flores G, Rodríguez-Moreno A (2020) Astrocyte-mediated switch in spike timing-dependent plasticity during hippocampal development. *Nat Commun* 11:4388.
- Feldman DE (2000) Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron* 27:45–56.
- Feldman DE (2012) Spike timing-dependence of plasticity. *Neuron* 75:556–571.
- Feldman DE, Brecht M (2005) Map plasticity in somatosensory cortex. *Science* 310:810–815.
- Froemke RC, Carcea I, Barker AJ, Yuan K, Seybold BA, Martins ARO, Zaika N, Bernstein H, Wachs M, Levis PA, Polley DB, Merzenich MM, Schreiner CE (2013) Long-term modification of cortical synapses improves sensory perception. *Nat Neurosci* 16:79–88.
- Gómez-Gonzalo M, Navarrete M, Perea G, Covelo A, Martín-Fernández M, Shigemoto R, Luján R, Araque A (2015) Endocannabinoids induce lateral long-term potentiation of transmitter release by stimulation of gliotransmission. *Cereb Cortex* 25:3699–3712.
- González-Rueda A, Pedrosa V, Feord RC, Clopath C, Paulsen O (2018) Activity-dependent downscaling of subthreshold synaptic inputs during slow-wave-sleep like activity *in vivo*. *Neuron* 97:1244–1252.
- Hagena H, Manahan-Vaughan D (2011) Learning-facilitated synaptic plasticity at CA3 mossy fiber and commissural-associational synapses reveals different roles in information processing. *Cereb Cortex* 21:2442–2449.
- Hensch TK (2004) Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci* 27:549–579.
- Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877–888.
- Huckstepp RT, id Bihi R, Eason R, Spyer KM, Dicke N, Willecke K, Marina N, Gourine AV, Dale N (2010) Connexin hemichannel-mediated CO₂-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J Physiol* 588:3901–3920.
- Inglebert Y, Aljadeff J, Brunel N, Debanne D (2020) Synaptic plasticity rules with physiological calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:33639–33648.
- Jo YH, Schlichter R (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci* 2:241–245.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen U, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10:331–339.
- Kerr M, Wall MJ, Richardson MJE (2013) Adenosine A₁ receptor activation mediates the developmental shift at layer 5 pyramidal cell synapses and is determinant of mature synaptic strength. *J Physiol* 591:3371–3380.
- Klyuch BP, Dale N, Wall MJ (2012) Deletion of ecto-5'-nucleotidase (CD73) reveals direct action potential-dependent adenosine release. *J Neurosci* 32:3842–3847.
- López de Armentia M, Sah P (2007) Bidirectional synaptic plasticity at nociceptive afferents in the rat central amygdala. *J Physiol* 581:961–970.
- Lovatt D, Xu Q, Liu W, Takano T, Smith NA, Schnermann J, Tieu K, Nedergaard M (2012) Neuronal adenosine release and not astrocytic ATP release mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:6265–6270.
- Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA (1994) Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 265:2098–2101.
- Markram H, Lübke J, Frotscher M, Sakmann B (1997) Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275:213–215.
- Mateos-Aparicio P, Rodríguez-Moreno A (2020) Calcium dynamics and synaptic plasticity. *Adv Exp Med Biol* 1131:965–984.

- Matyash V, Filippov V, Mohrhagen K, Kettenmann H (2001) Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice. *Mol Cell Neurosci* 18:664–670.
- McGuinness L, Taylor C, Taylor RD, Yau C, Langenhan T, Hart M, Christian H, Tynan P, Donnelly P, Emptage N (2010) Presynaptic NMDARs in the hippocampus facilitate transmitter release at theta frequency. *Neuron* 68:1109–1127.
- Mederos S, González-Arias C, Perea G (2018) Astrocyte-neuron networks: a multilane highway of signaling for homeostatic brain function. *Front Synaptic Neurosci* 10:45.
- Meredith RM, Floyer-Lea AM, Paulsen O (2003) Maturation of long-term potentiation induction rules in rodent hippocampus: role of GABAergic inhibition. *J Neurosci* 23:11142–11146.
- Min MY, Asztely F, Kokaia M, Kullmann DM (1998) Long-term potentiation and dual component quantal signaling in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4702–4707.
- Min R, Nevian T (2012) Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nat Neurosci* 15:746–753.
- Monday HR, Younts TJ, Castillo PE (2018) Long-term plasticity of neurotransmitter release: emerging mechanisms and contributions to brain function and disease. *Annu Rev Neurosci* 41:299–322.
- Navarrete M, Díez A, Araque A (2014) Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20130599.
- Nevian T, Sakmann B (2006) Spine Ca^{2+} signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci* 26:11001–11013.
- Nicoll RA, Schmitz D (2005) Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:863–876.
- Padamsey Z, Emptage N (2014) Two sides to long-term potentiation: a view towards reconciliation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20130154.
- Padamsey Z, Tong R, Emptage N (2017) Glutamate is required for depression but not potentiation of long-term presynaptic function. *Elife* 6:e29688.
- Panatier A, Vallée J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785–798.
- Parpura V, Zorec R (2010) Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 63:83–92.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sánchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113–116.
- Paulsen O, Moser EI (1998) A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 21:273–278.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083–1086.
- Pérez-Otaño I, Rodríguez-Moreno A (2019) Presynaptic NMDARs and astrocytes ally to control circuit-specific information flow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:13166–13168.
- Pérez-Rodríguez M, Arroyo-García LE, Prius-Mengual J, Andrade-Talavera Y, Armengol JA, Pérez-Villegas EM, Duque-Feria P, Flores G, Rodríguez-Moreno A (2019) Adenosine receptor-mediated developmental loss of spike timing-dependent depression in the hippocampus. *Cereb Cortex* 29:3266–3281.
- Pigott M, Garthwaite J (2016) Nitric oxide is required for l-type $\text{Ca}(2+)$ channel-dependent long-term potentiation in the hippocampus. *Front Synaptic Neurosci* 8:17.
- Ramón y Cajal S (1894) The Croonian lecture: la fine structure des centres nerveux. *Proc Royal Soc London* 55:444–468.
- Rex CS, Kramár EA, Colgin LL, Lin B, Gall CM, Lynch G (2005) Long-term potentiation is impaired in middle-aged rats: regional specificity and reversal by adenosine receptor antagonists. *J Neurosci* 25:5956–5966.
- Ribot J, Breton R, Calvo CF, Moulard J, Ezan P, Zapata J, Samama K, Moreau M, Bemelmans AP, Sabater V, Dingli F, Loew D, Milleret C, Billuart P, Dallérac G, Rouach N (2021) Astrocytes close the mouse critical period for visual plasticity. *Science* 373:77–81.
- Rodríguez-Moreno A, Paulsen O (2008) Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci* 11:744–745.
- Rodríguez-Moreno A, Sistiaga A, Lerma J, Sánchez-Prieto J (1998) Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization. *Neuron* 21:1477–1486.
- Rodríguez-Moreno A, Banerjee A, Paulsen O (2010) Presynaptic NMDA receptors and spike timing-dependent depression at cortical synapses. *Front Synaptic Neurosci* 2:18.
- Rodríguez-Moreno A, Kohl MM, Reeve J, Eaton TR, Collins HA, Anderson HL, Paulsen O (2011) Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment specific photorelease of a use-dependent NMDA antagonist. *J Neurosci* 31:8564–8569.
- Rodríguez-Moreno A, González-Rueda A, Banerjee A, Upton ML, Craig M, Paulsen O (2013) Presynaptic self-depression at developing neocortical synapses. *Neuron* 77:35–42.
- Salin PA, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* 16:797–803.
- Sardinha VM, Guerra-Gomes S, Caetano I, Tavares G, Martins M, Reis JS, Correia JS, Teixeira-Castro A, Pinto L, Sousa N, Oliveira JF (2017) Astrocytic signaling supports hippocampal-prefrontal theta synchronization and cognitive function. *Glia* 65:1944–1960.
- Savtchouk I, Di Castro MA, Ali R, Stubbe H, Luján R, Volterra A (2019) Circuit-specific control of the medial entorhinal inputs to the dentate gyrus by atypical presynaptic NMDARs activated by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:13602–13610.
- Sebastião AM, Cunha RA, de Mendonça A, Ribeiro JA (2000) Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *Br J Pharmacol* 131:1629–1634.
- Sultan S, Li L, Moss J, Petrelli F, Cassé F, Gebara E, Lopatar J, Pfrieger FW, Bezzi P, Bischofberger J, Toni N (2015) Synaptic integration of adult-born hippocampal neurons is locally controlled by astrocytes. *Neuron* 88:957–972.
- Tovote P, Fadok JP, Lüthi A (2015) Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 16:317–331.
- Wall MJ, Dale N (2013) Neuronal transporter and astrocytic ATP exocytosis underlie activity-dependent adenosine release in the hippocampus. *J Physiol* 591:3853–3871.
- zur Nedden S, Hawley S, Pentland N, Hardie DG, Doney AS, Frenguelli BG (2011) Intracellular ATP influences synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampus via metabolism to adenosine and activity-dependent activation of A1 receptors. *J Neurosci* 31:6221–6234.

Adenosine and Astrocytes Control Critical Periods of Neural Plasticity

The Neuroscientist
1–6
© The Author(s) 2022
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: [10.1177/10738584221126632](https://doi.org/10.1177/10738584221126632)
journals.sagepub.com/home/nro



Irene Martínez-Gallego¹ and Antonio Rodríguez-Moreno¹ 

Abstract

Windows of plasticity are fundamental for the correct formation of definitive brain circuits; these periods drive sensory and motor learning during development and ultimately learning and memory in adults. However, establishing windows of plasticity also imposes limitations on the central nervous system in terms of its capacity to recover from injury. Recent evidence highlights the important role that astrocytes and adenosine seem to play in controlling the duration of these critical periods of plasticity.

Keywords

brain plasticity, critical periods of plasticity, plasticity windows, astrocyte, adenosine

Importance of Windows of Plasticity

It is known that the ability to play a musical instrument, to learn a language, or to develop sensory and motor skills is associated with periods of plasticity during development. Indeed, it is generally assumed that these skills are better acquired when trained at younger ages, which is attributed to the plasticity in the brain during specific periods of pre- and postnatal development. Plasticity is the ability to induce modifications in response to experience or external stimuli, and it is one of the most interesting properties of the mammalian brain. Indeed, plasticity is involved in the organization of cortical maps during development, as well as in learning and memory processes in the adult, and the disruption of plasticity in early postnatal periods may underlie neurodevelopmental diseases. Since it was first discovered (Bliss and others 2013; Cajal 1984; Mateos-Aparicio and Rodríguez-Moreno 2019), it was clear that synaptic plasticity is a phenomenon that varies over the individual's lifetime and that it is a changing and evolving process. Indeed, critical and permissive periods of plasticity exist during development that are referred to as *windows of plasticity*. Intense activity/sensory-dependent plasticity occurs in these windows, with environmental experiences exerting the strongest impact on brain circuits in the permissive periods and with these inputs driving maximal plasticity in specific brain circuits during the critical periods. The reordering and refinement of neural connections in these windows of plasticity establish the definitive synapses and circuits responsible for the correct physiology in adults (Hensch 2004). After these critical periods, there is a loss of plasticity at particular synapses (Hensch 2004,

2005). Accordingly, there has been much interest in better understanding the mechanisms and secrets behind the critical periods of plasticity in recent years, not least with a view to possibly develop new therapies for pathologic conditions in humans (Dromerick and others 2021) and to correct miswired neuronal circuits. Moreover, such information may help improve educational training and rehabilitation, enhancing recovery from traumatic injury and lesions in the adult brain. One of the fundamental questions in the field is whether the windows of critical periods can be modified or recovered later in life. Significantly, the answer to this question seems to be "yes," and what is more, GABAergic activity and adenosine and astrocyte signaling seem to be fundamental elements in these processes.

Influence of GABAergic Inhibition on the Windows of Plasticity

There is increasing evidence that GABAergic inhibition is crucial for certain aspects of brain development and to control certain windows of plasticity. Since the experiments of Hubel and Wiesel (2004) >55 y ago and those of Hensch (2005) on amblyopia, GABAergic inhibition has been proposed as a mechanism to control critical periods of plasticity (Hensch 2004). This is true at some

¹Universidad Pablo de Olavide, Seville, Spain

Corresponding Author:

Antonio Rodríguez-Moreno, Universidad Pablo de Olavide, Ctra. de Utrera Km 1, Sevilla, 41013, Spain.
Email: arodmor@upo.es

synapses in the somatosensory and visual cortices where GABAergic inhibition was seen to be involved in these periods of plasticity (Hensch 2004), yet it is not clear whether this is a general mechanism that acts in all brain regions. The evidence available seems to suggest that this is not the case, as it was recently seen that astrocytes and adenosine fulfill a crucial role in controlling or defining the duration of the critical period of plasticity in the auditory and somatosensory cortices and in the hippocampus, processes in which GABAergic inhibition is not involved (Blundon and others 2017; Falcón-Moya and others 2020; Martínez-Gallego, Pérez-Rodríguez, and others 2022; Pérez-Rodríguez and others 2019). Here we consider the importance of astrocyte and adenosine signaling in controlling the onset and duration of critical periods of neuronal plasticity.

Astrocytes and Adenosine Influence the Dynamics of Plasticity during Postnatal Development

Recent evidence indicates that events unrelated to GABAergic inhibition may control critical periods of plasticity. Thus, at CA3–CA1 synapses in the hippocampus, a form of presynaptic spike timing-dependent long-term depression (t-LTD) was recently discovered that is present during the first weeks of mouse development but disappears during the fourth week of postnatal life (Andrade-Talavera and others 2016; Falcón-Moya and others 2020; Martínez-Gallego, Pérez-Rodríguez, and others 2022; Pérez-Rodríguez and others 2019). The mechanisms involved in this loss of plasticity include enhanced adenosine activation of presynaptic type 1 adenosine receptors (A_1Rs) with maturation. Interestingly, the adenosine that activates A_1Rs is most probably released by astrocytes, as the effects of this A_1Rs activation are always observed just after astrocyte stimulation or signaling is induced (Figure 1). Indeed, it was elegantly demonstrated that an antagonist of A_1R recovers t-LTD when it is lost after the fourth week of development. Moreover, in the presence of an agonist of A_1R , the window of plasticity can be closed and can be t-LTD impaired during the first 3 wk of postnatal development, shortening of this critical period of plasticity. This is a clear indication of how the duration of the critical period of plasticity can be manipulated pharmacologically during postnatal development. However, it remains to be determined whether the adenosine that mediates this loss of plasticity is directly or indirectly released by astrocytes. It is particularly notable that once the critical period of t-LTD at CA3–CA1 synapses has terminated during the fourth week of postnatal development, the same protocol of plasticity induces timing-dependent long-term potentiation (t-LTP) instead. Thus, the natural series of events

seems to be the existence of t-LTD for 3 to 4 wk, followed by a switch from t-LTD to t-LTP in response to the same (natural) stimuli (Falcón-Moya and others 2020). This switch from t-LTD to t-LTP with maturation is also mediated by the increased levels of adenosine and enhanced A_1R activation that persist after the critical period for t-LTD closes. Moreover, this increase in adenosine continues to be dependent on astrocyte signaling, as the switch requires astrocyte gliotransmitter release, reflecting the central role of astrocytes in controlling the duration of these periods of plasticity (Falcón-Moya and others 2020; Figure 1).

Very recently, a similar mechanism for t-LTD was observed at synapses of the somatosensory cortex from layer 4 to layer 2/3 (L4–L2/3); specifically, there is a form of t-LTD at L4–L2/3 synapses in the somatosensory cortex that disappears after the first weeks of postnatal development (in this case during the fifth week). Here, as in the hippocampus, the loss of plasticity is due to an increase in the activation of presynaptic A_1Rs and astrocytic signaling (Martínez-Gallego, Pérez-Rodríguez, and others 2022). Results are consistent with the predictions of biophysicochemical models of somatosensory cortical L4–L2/3 t-LTD in vivo (Linne and others 2022; Manninen and others 2020). In addition, and as observed in the hippocampus (Falcón-Moya and others 2020), a switch from t-LTD to t-LTP is seen once t-LTD is lost, again because of the continued increase in adenosine and astrocyte signaling with maturation (Martínez-Gallego, Pérez-Rodríguez, and others 2022; Figure 2). The fact that a mechanism involving adenosine and astrocyte signaling controls the onset and duration of a critical period of plasticity suggests that this may be a general mechanism to control the duration of critical periods of plasticity in the central nervous system, probably because of their effect on presynaptic glutamate release and the differential activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors and/or metabotropic glutamate receptors (Falcón-Moya and others 2020; Martínez-Gallego, Pérez-Rodríguez, and others 2022; Martínez-Gallego, Rodríguez-Moreno, and Andrade-Talavera 2022; Pérez-Otaño and Rodríguez-Moreno 2019). More research will determine whether this mechanism is more widely seen in the brain than that involving GABAergic inhibition and whether these mechanisms act together or are complementary. The loss of t-LTD and the switch to t-LTP are very important, as t-LTD seems to be fundamental for the pruning and refinement of synaptic connections in young animals. As such, this phenomenon has been proposed to play important roles in map plasticity during development. Furthermore, after the critical period has passed, t-LTD may weaken excitatory synapses that are underused or behaviorally irrelevant. By contrast, t-LTP seems to have a direct role in learning and memory processes in adults.

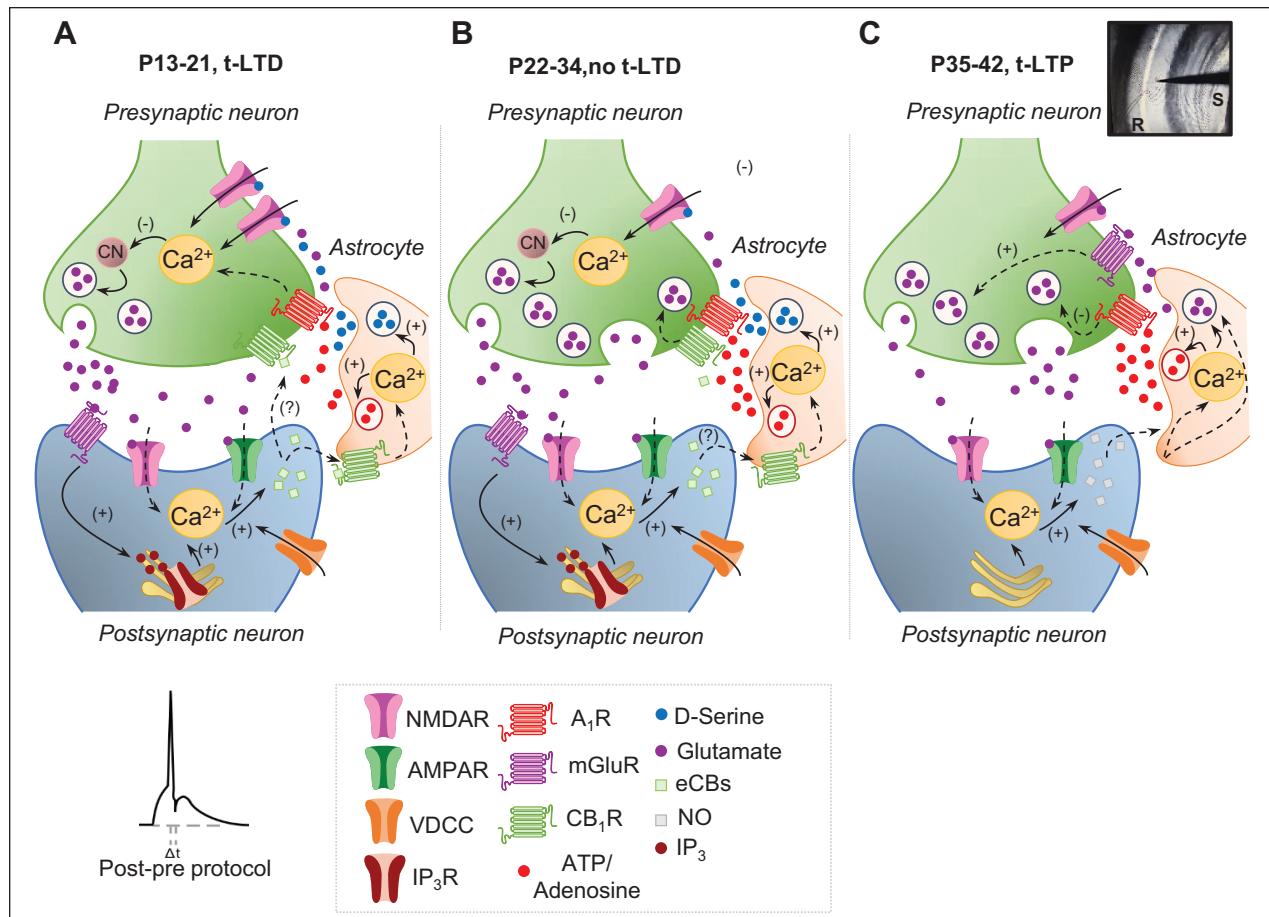


Figure 1. Scheme showing signaling at early (P13–P21), juvenile (P22–P34), and adult (P35–P42) stages of development at CA3–CA1 synapses of the hippocampus. (A) At P13 to P21, a presynaptic form of t-LTD is induced by a post-pre single-spike pairing protocol (i.e., postsynaptic action potential preceded presynaptic stimulation). In this form of t-LTD, postsynaptic action potentials activate VDCCs, and the presynaptically released glutamate activates postsynaptic mGluR, activating PLC and provoking Ca^{2+} release from internal stores and DAG production, which serves as a precursor for eCB synthesis. For t-LTD, an eCB signal is necessary to activate CB₁ receptors to facilitate d-serine release from astrocytes. With the glutamate released from presynaptic neurons, this d-serine is known to activate presynaptic NMDARs on Schaffer collateral boutons, leading to an increase in presynaptic Ca^{2+} release, calcineurin activation, and synaptic depression. Modified from Andrade-Talavera and others (2016). (B) At P22 to P34, no plasticity is observed. Modified from Pérez-Rodríguez and others (2019). (C) At P35 to P32, t-LTD is not observed, and instead the same post-pre protocol induces presynaptic t-LTP. At this developmental stage, the probability of release has considerably decreased owing to an increase in adenosine release from astrocytes as compared with P13 to P21. Also different from t-LTD, as induced by the same protocol at P13 to P21, eCB signaling and NMDARs are not required for presynaptic t-LTP. For the induction of t-LTP, postsynaptic action potentials activate VDCCs, causing calcium release from internal stores and inducing NO synthesis. The NO signal leads to the activation of astrocytes to release glutamate and/or adenosine to activate presynaptic mGluR5 and A₁R, respectively, on Schaffer collateral boutons. A₁R activation considerably reduces neurotransmitter probability release, whereas mGluR5 activation leads to a long-lasting increase in glutamate release and synaptic potentiation. Modified from Falcón-Moya and others (2020). A₁R = type I adenosine receptor; AMPAR = α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; CB₁R = type I cannabinoid receptor; DAG = diacyl glicerol; eCB = endocannabinoid; IP₃ = inositol triphosphate; IP₃R = inositol triphosphate receptor; mGluR = metabotropic glutamate receptor; NMDAR = N-methyl-D-aspartate receptor; NO = nitric oxide; P = postnatal day; PLC = phospholipase C; t-LTD = timing-dependent long-term depression; t-LTP = timing-dependent long-term potentiation; VDCC = voltage-dependent Ca^{2+} channel.

Interesting discoveries have also been made at thalamocortical synapses. Thalamocortical LTD or LTP cannot normally be induced in slices from animals older than 2 to 3 wk of age, and LTP and LTD at thalamocortical projections are known to be restricted to the same critical

period as cortical map plasticity (Crair and Malenka 1995). Significantly, a form of LTD not present in adults is rescued when adenosine is downregulated by the activation of presynaptic muscarinic M1 receptors in brain slices containing the auditory thalamus and cortex

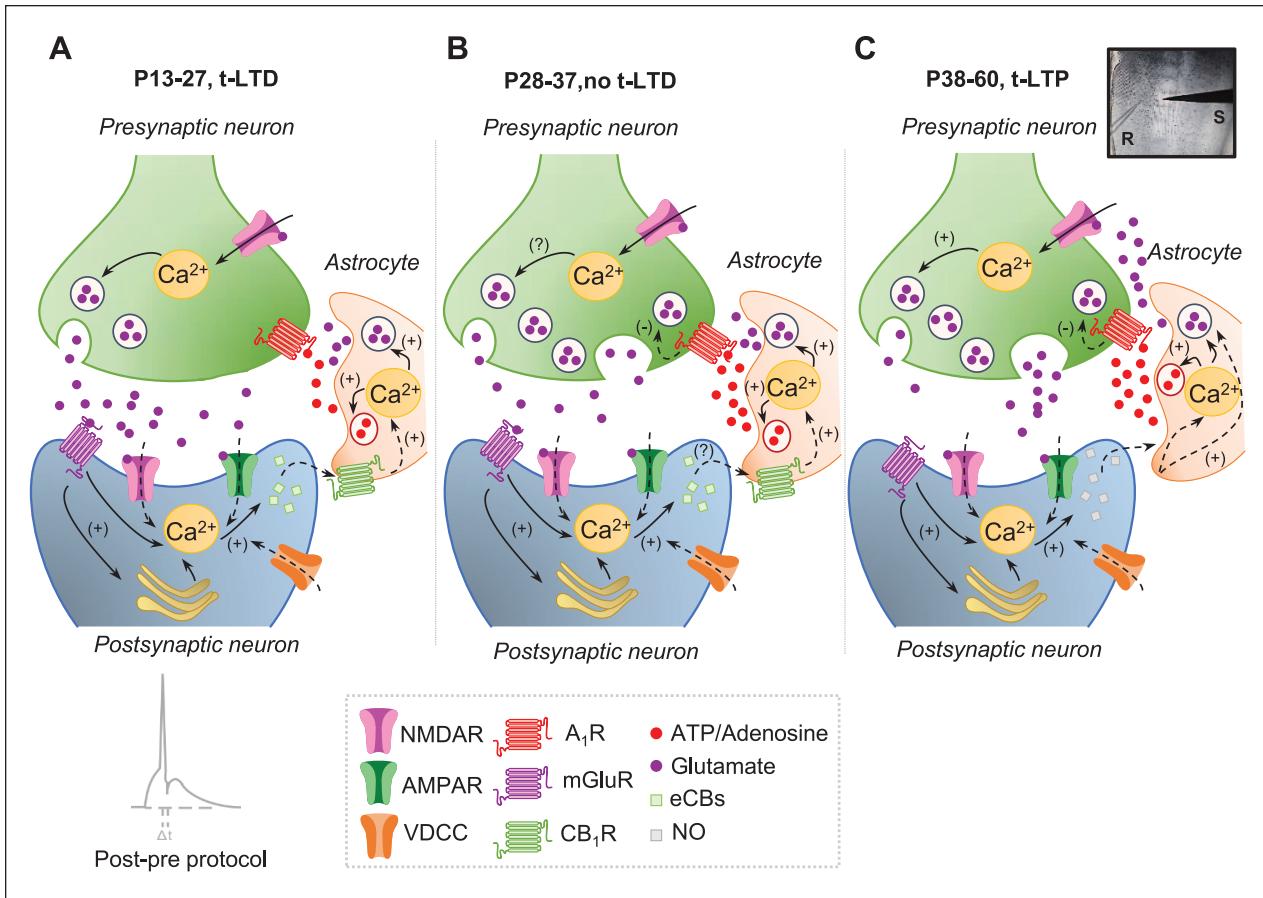


Figure 2. Scheme showing signaling at early (P13–P27), juvenile (P28–P37), and adult (P38–P60) stages of development at synapses of the somatosensory cortex from layer 4 to layer 2/3 (L4–L2/3). (A) At P13 to P27, a presynaptic form of t-LTD is induced by a post-pre protocol (i.e., postsynaptic action potential preceded presynaptic stimulation). In this t-LTD, postsynaptic action potentials activate VDCCs, and the presynaptically released glutamate activates postsynaptic mGluR, provoking Ca^{2+} release from internal stores and eCB synthesis. For t-LTD, an eCB signal is necessary to activate CB₁ receptors to facilitate glutamate release from astrocytes. With the glutamate released from presynaptic neurons, this glutamate is known to activate presynaptic NMDARs on L4 boutons, leading to an increase in presynaptic Ca^{2+} release and synaptic depression. (B) At P28 to P37, t-LTD does not develop, and the main difference with regard to P13 to P27 is an increase in adenosine release from astrocytes at P28 to P37 as compared with P13 to P27. (C) At P38 to P60, t-LTD is not only lost but also switched to a presynaptic form of t-LTP. For the induction of this presynaptic form of t-LTP, postsynaptic action potentials activate VDCCs, causing calcium release from internal stores and inducing NO synthesis. The NO signal leads to the activation of astrocytes to release glutamate and/or adenosine to activate NMDARs and A₁R, respectively, on L4 boutons. A₁R activation considerably reduces neurotransmitter probability release, whereas NMDAR activation leads to a long-lasting increase in glutamate release and synaptic potentiation. Modified from Martínez-Gallego, Pérez-Rodríguez, and others (2022). A₁R = type I adenosine receptor; AMPAR = α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; CB₁R = type I cannabinoid receptor; eCB = endocannabinoid; mGluR = metabotropic glutamate receptor; NMDAR = N-methyl-D-aspartate receptor; NO = nitric oxide; P = postnatal day; t-LTD = timing-dependent long-term depression; t-LTP = timing-dependent long-term potentiation; VDCC = voltage-dependent Ca^{2+} channel.

(Blundon and others 2011). Hence, the release of presynaptic gating mechanisms appears to allow mature thalamocortical synapses to undergo LTD. Interestingly, GABAergic synapses do not appear to participate in this process, as LTD is present in the presence of picrotoxin (Blundon and others 2011). At the same synapses, LTP can be induced in young animals but is not normally

observed at postnatal days 35 to 42. This form of LTP is also gated by adenosine from the thalamus in adults as it can be rescued by dampening presynaptic A₁R activation (Chun and others 2013). It is noteworthy that experiments *in vivo* showed that windows of thalamocortical synapse plasticity can be closed by activating A₁Rs in young animals (Blundon and others 2017). In addition, blocking or

deleting A₁Rs at postnatal days 45 to 56 improves cortical map plasticity, and it recovers LTP and LTD beyond the critical period. However, the possible role of astrocytes that release ATP/adenosine at thalamocortical auditory synapses has yet to be explored, as is also the case for the role of adenosine *in vivo* in the hippocampus and somatosensory cortex.

As indicated, GABAergic and adenosine signaling appears to influence the duration of critical periods of plasticity. Adenosine (released directly or as ATP that is then converted to adenosine in the extracellular medium) seems to be released directly by astrocytes in the hippocampus (Pérez-Rodríguez and others 2019) and somatosensory cortex (Martínez-Gallego, Pérez-Rodríguez, and others 2022), and in these two regions astrocyte signaling has clearly been established as being necessary for the loss of t-LTD. Nevertheless, it remains possible that adenosine is released indirectly after astrocyte gliotransmitter release, which will need to be unequivocally clarified by further research. Apart from the earlier studies that first described a role for astrocytes in closing a critical period of plasticity (Falcón-Moya and others 2020; Pérez-Rodríguez and others 2019), astrocytes were recently found to control the closure of a critical window in the mouse visual cortex by affecting extracellular matrix proteins (Ribot and others 2021). Likewise, in *Drosophila melanogaster*, astrocytes were seen to control the closing of a critical period of plasticity in a motor circuit by affecting neuroligin and neurexin signaling (Ackerman and others 2021). Whether astrocytes participate in the release of adenosine in these two critical periods remains to be determined.

Conclusions

In addition to other mechanisms, recent evidence indicates that astrocytes and adenosine are new and important elements that can define the duration of critical periods of plasticity. Combinations of sensory motor training and pharmacologic or molecular interventions may act synergistically to enhance plasticity and permit functionality to be recovered after injury. The possible pharmacologic manipulations mentioned here may also have transcendental consequences, allowing closed windows of plasticity to be opened and permit renewed learning, which may pave the way to combat some neurologic diseases. As such, these are currently exciting times for those interested in understanding how, and through what natural stimuli, critical periods of plasticity are controlled.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Research in the Rodríguez-Moreno laboratory has been supported by the Agencia Estatal de Investigación/FEDER (grant PID2019-107677GB-I00) and Junta de Andalucía/FEDER (grant P20_0881).

ORCID iD

Antonio Rodríguez-Moreno  <https://orcid.org/0000-0002-8078-6175>

References

- Ackerman SD, Pérez-Catalán NA, Freeman MR, Doe CQ. 2021. Astrocytes close a motor circuit critical period. *Nature* 592:414–20.
- Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Paulsen O, Rodríguez-Moreno A. 2016. Presynaptic spike timing-dependent long-term depression in the mouse hippocampus. *Cereb Cortex* 26:3637–54.
- Bliss TV, Collingridge GL, Morris RG. 2013. Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. *Philos Trans Royal Soc B* 36:20130129.
- Blundon JA, Bayazitov IT, Zakharenko SS. 2011. Presynaptic gating of postsynaptically expressed plasticity at mature thalamocortical synapses. *J Neurosci* 31:16012–25.
- Blundon JA, Roy NC, Teubner BJW, Yu J, Eom TY, Sample KJ, et al. 2017. Restoring auditory cortex plasticity in adult mice by restricting thalamic adenosine signaling. *Science* 356:1352–56.
- Cajal SR. 1984. The Croonian lecture: la fine structure des centres nerveux. *Proc Royal Soc London* 55:444–68.
- Chun S, Bayazitov IT, Blundon JA, Zakharenko SS. 2013. Thalamocortical long-term potentiation becomes gated after the early critical period in the auditory cortex. *J Neurosci* 33:7345–57.
- Craig MC, Malenka RC. 1995. A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375:325–8.
- Dromerick AW, Geed S, Barth J, Brady K, Giannetti ML, Mitchell A, et al. 2021. Critical Period After Stroke Study (CPASS): a phase II clinical trial testing an optimal time for motor recovery after stroke in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(59):e2026676118.
- Falcón-Moya R, Pérez-Rodríguez M, Prius-Mengual J, Andrade-Talavera Y, Arroyo-García LE, Pérez-Artés R, et al. 2020. Astrocyte-mediated switch in spike timing-dependent plasticity during hippocampal development. *Nat Comm* 11:4388.
- Hensch TK. 2004. Critical period regulation. *Ann Rev Neurosci* 27:549–79.
- Hensch TK. 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877–88.
- Hubel DM, Wiesel TN. 2004. Brain and visual perception: the story of a 25-year collaboration. Oxford (UK): Oxford University Press.
- Linne M-L, Aćimović J, Saudargiene A, Manninen T. 2022. Neuron-glia interactions and brain circuits. *Adv Exp Med Biol* 1359:87–103.
- Manninen T, Saudargiene A, Linne M-L. 2020. Astrocyte-mediated spike-timing-dependent long-term depression

- modulates synaptic properties in the developing cortex. *PLoS Comput Biol* 16(11):e1008360.
- Martínez-Gallego I, Pérez-Rodríguez M, Coatl-Cuaya H, Flores G, Rodríguez-Moreno A. 2022. Adenosine and astrocytes determine the developmental dynamics of spike timing-dependent plasticity in the somatosensory cortex. *J Neurosci* 42(31):6038–52.
- Martínez-Gallego I, Rodríguez-Moreno A, Andrade-Talavera Y. 2022. Role of group I metabotropic receptors in spike timing-dependent plasticity. *Int J Mol Sci* 23(14):7807.
- Mateos-Aparicio P, Rodríguez-Moreno A. 2019. The impact of studying brain plasticity. *Front Cell Neurosci* 13:66.
- Pérez-Otaño I, Rodríguez-Moreno A. 2019. Presynaptic NMDARs and astrocytes ally to control circuit-specific information flow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(27): 13166–8.
- Pérez-Rodríguez M, Arroyo-García LE, Prius-Mengual J, Andrade-Talavera Y, Armengol JA, Pérez-Villegas EM, et al. 2019. Adenosine receptor-mediated developmental loss of spike timing-dependent depression in the hippocampus. *Cereb Cortex* 29:3266–81.
- Ribot J, Breton R, Calvo CF, Moullard J, Ezan P, Zapata J, et al. 2021. Astrocytes close the mouse critical period for visual plasticity. *Science* 373:77–81.



Opinion

Role of Group I Metabotropic Glutamate Receptors in Spike Timing-Dependent Plasticity

Irene Martínez-Gallego, Antonio Rodríguez-Moreno * and Yuniesky Andrade-Talavera *

Laboratory of Cellular Neuroscience and Plasticity, Department of Physiology, Anatomy and Cell Biology, Universidad Pablo de Olavide, ES-41013 Seville, Spain; imargal@upo.es

* Correspondence: arodmor@upo.es (A.R.-M.); yandal@upo.es (Y.A.-T.)

Abstract: Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are G-protein-coupled receptors that exhibit enormous diversity in their expression patterns, sequence homology, pharmacology, biophysical properties and signaling pathways in the brain. In general, mGluRs modulate different traits of neuronal physiology, including excitability and plasticity processes. Particularly, group I mGluRs located at the pre- or postsynaptic compartments are involved in spike timing-dependent plasticity (STDP) at hippocampal and neocortical synapses. Their roles of participating in the underlying mechanisms for detection of activity coincidence in STDP induction are debated, and diverse findings support models involving mGluRs in STDP forms in which NMDARs do not operate as classical postsynaptic coincidence detectors. Here, we briefly review the involvement of group I mGluRs in STDP and their possible role as coincidence detectors.

Keywords: STDP; glutamate receptor; mGluR; timing; synaptic plasticity



Citation: Martínez-Gallego, I.; Rodríguez-Moreno, A.; Andrade-Talavera, Y. Role of Group I Metabotropic Glutamate Receptors in Spike Timing-Dependent Plasticity. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7807. <https://doi.org/10.3390/ijms23147807>

Academic Editors: Nicola B. Mercuri and Ada Ledonne

Received: 22 June 2022

Accepted: 14 July 2022

Published: 15 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter of the central nervous system, and its actions are mediated by the activation of a diverse family of receptors that can be divided into two large sets comprising ionotropic glutamate receptors (the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA)-, N-methyl-D-aspartate (NMDA)- and kainate (KA)-type receptors) and metabotropic glutamate receptors (mGluRs). Although the fast glutamate excitatory synaptic transmission is typically mediated by the ionotropic ligand-gated glutamate receptors, the slower and long-lasting effects of glutamate are generally mediated by mGluRs [1,2]. mGluRs are G-protein-coupled receptors (GPCRs) that share common topology and exhibit enormous diversity in their expression patterns, sequence homology, pharmacology, biophysical properties and signaling pathways among the different receptor's subtypes [2,3].

Based on these properties, mGluRs can be divided into three groups: group I, II and III (mGluR I, mGluR II and mGluR III, respectively). mGluR I includes mGluR1 and mGluR5 receptors that are positively coupled to phospholipase C (PLC), whereas mGluR II (comprising mGluR2 and mGluR3) and mGluR III (including mGluR4 and mGluR6-8) are negatively coupled to the formation of adenylate cyclase-mediated cAMP [4]. The metabotropic nature of mGluR signaling was first discovered by the demonstration that glutamate could stimulate the formation of inositol trisphosphate (IP_3) production, thus showing that glutamate, similar to other neurotransmitters such as acetylcholine, could also trigger intracellular pathways by activating G protein-coupled receptors [5].

mGluRs modulate different aspects of neuronal physiology, particularly, excitability and plasticity [1,4,6]. They are widely expressed throughout the brain and are found at both pre- and postsynaptic sites of excitatory glutamatergic synapses. Their location makes mGluRs ideally suited to modulate diverse processes and mechanisms of synaptic transmission and plasticity (e.g., glutamate release and intracellular pathways underlying postsynaptic forms of plasticity). Synaptic plasticity has been widely accepted as a

possible functional substrate for memory encoding, information processing and neuronal circuit refinement during development [7]. In a classical view, repetitive activation of synapses drives synaptic changes that entail long-term potentiation (LTP) or long-term depression (LTD) of the synaptic transmission. These forms of long-term changes of synaptic strength studied in ex vivo and in vivo preparations depend on the pattern of stimulation used [8–13]. For instance, high-frequency stimulation-induced LTP (HFS-LTP) has been intensively studied and it is known to be NMDAR-dependent [5,14].

Under certain conditions, mGluRs can serve as co-triggers for the induction of NMDAR-dependent LTP [15,16], possibly by facilitating the activation of NMDARs [6,17]. mGluR II is well known to be involved in LTD in the hippocampus [18–20] and mGluR III has also been involved in plasticity [21,22]. Depending on the brain region, postsynaptic cell type, and specific intracellular pathways, mGluR I is particularly known for inducing LTD, which can be mediated by either mGluR1 or mGluR5 [23,24]. In addition to their role in LTD, the activation of mGluR I potentiates NMDA-receptor-mediated currents [25,26], and it can also depolarize several types of neurons through activation of a Ca^{2+} -dependent cation conductance [27,28].

Some conceptual controversies exist regarding the role of mGluR I and the type of synaptic plasticity it involves (see Jones, 2017; [29] for review). Notably, this group of metabotropic receptors was proposed as a crucial player in the mechanisms underlying the detection of activity coincidence in the form of synaptic plasticity that depends on the precise temporal coincidence and order of pre- and postsynaptic activities: the spike timing-dependent plasticity (STDP) [30–32]. STDP has been found in all of the species in which it has been studied (from insects to humans) [33]. Different forms of STDP have been described depending on the specific cell and synapse type [34–40], the state of the network [41], neuromodulatory agents [42,43] and the developmental stage [44,45] in which the study was carried out, and it is believed that STDP endows a supporting role to memory formation and maintenance [9,30]. Here, we review and discuss the involvement of mGluR I in STDP and its role as a coincidence detector.

2. The STDP Phenomena and mGluRs Involvement

STDP is a form of synaptic plasticity in which the coincidence of pre- and postsynaptic activities (spiking) within a few milliseconds dictates a long-lasting potentiation (t-LTP) or depression (t-LTD) of synaptic transmission depending on the order of the spiking occurrence. In excitatory synapses, when the presynaptic firing precedes the postsynaptic spiking (“pre-post”), t-LTP is induced, whereas when the order is the inverse (“post-pre”), t-LTD is induced [30,33] (Figure 1). However, there are exceptions according to the recent advances in the field (i.e., post-pre protocol induces t-LTP in the hippocampal area CA1 of mice at postnatal days 35–42 (P35-P42) [44], Figure 1B) (see also Feldman, 2012; [30] for review).

Different forms of STDP were found in diverse brain areas, including the hippocampus [34,44,46], diverse cortical synapses [36,45,47–49], the cerebellum [38], the spinal cord [50], the striatum [37] and the amygdala [51] among others, and mGluR I is involved in t-LTP and t-LTD at different synapses in some of the these regions, covering different functions. Thus, in the somatosensory cortex, postsynaptic mGluR I participates in the production and release of eCB, which acts as a retrograde signaling molecule [47]; in neocortical synapses onto interneurons, where it participates in t-LTD [52]; in the *substantia gelatinosa*, it regulates the polarity of STDP [50] and in corticostriatal synapses, it acts as a coincidence detector for t-LTD [37]. In the cerebellum, mGluR I participates in the induction of t-LTP but not t-LTD [38]. Recently, it has been observed that eyeblink conditioning, a form of Pavlovian learning that engages discrete areas of the cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei, is impaired in mGluR1 knockout mice. Moreover, administration of the mGluR1/5 agonist DHPG into the *lobulus simplex* region of the cerebellar cortex promotes eyeblink conditioning in rats, which indicates that cerebellar mGluR1 plays a role in cerebellar-dependent associative learning [53]. mGluRs have been also found to be involved in STDP in the hippocampus,

where they seem to gate NMDAR-mediated t-LTP [54], participate postsynaptically in the induction of a presynaptic form of t-LTD by promoting the production and release of eCB that acts as a retrograde signaling molecule [34,44] or presynaptically participate in a newly discovered form of presynaptic t-LTD [44]. Whether t-LTD and t-LTP occur at the same time on the same synapse, the underlying pathways involved in their expression remain to be fully determined. Additionally, whether these forms of STDP share the same or distinct pools of Ca^{2+} in the same dendritic spine is still puzzling and deserves further research.

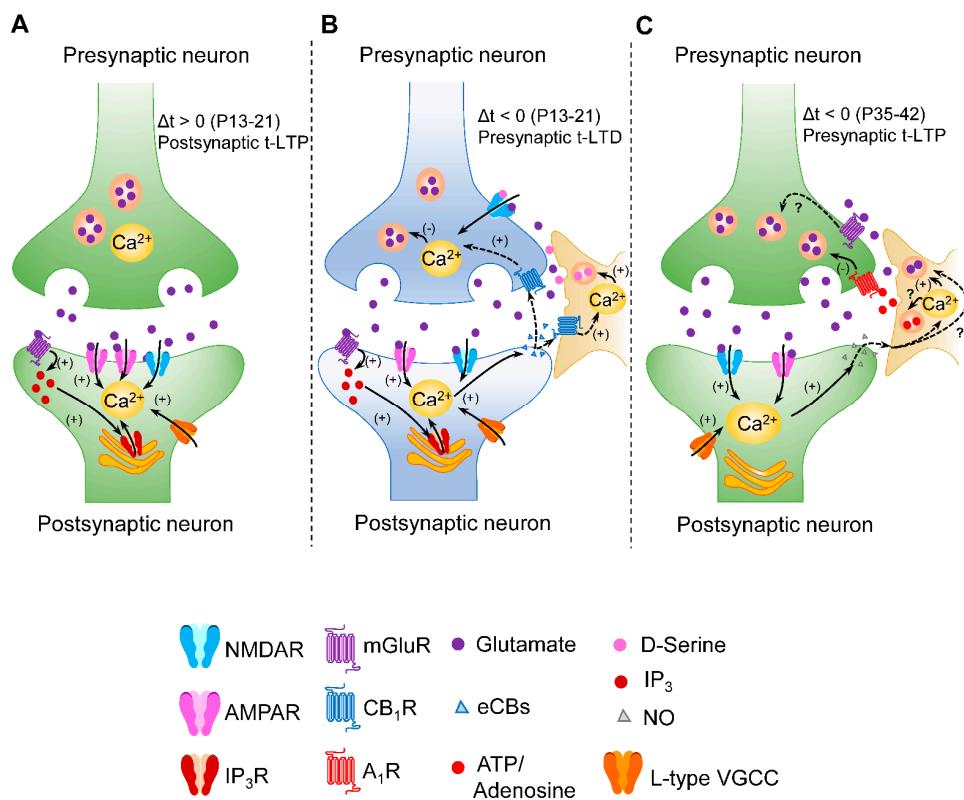


Figure 1. Schematic summarizing the role of mGluR I in different forms of STDP, showing that two different large sets of STDP forms could be proposed according to the underlying mechanism for coincidence detection: (A) In a classic model of Hebbian STDP, postsynaptic NMDARs are the main coincidence detectors (providing strong and brief Ca^{2+} signals) that drive postsynaptic forms of t-LTP and could also involve postsynaptic VGCCs, postsynaptic mGluRs and IP₃R-mediated increase in postsynaptic Ca^{2+} [30,33,34,47,50]. This model does not fully support the mechanism underlying postsynaptic NMDAR-dependent t-LTD at horizontal layer 2/3-layer 2/3 synapses of the primary somatosensory cortex [36]. Consequently, more research needs to be performed. In turn, other findings support the proposed model involving the mGluR-VGCC-IP₃R pathway in presynaptic forms of t-LTD as shown in B and t-LTP as shown in C as representative examples. In these studies, presynaptic forms of STDP either involve non-postsynaptic and likely presynaptic NMDARs and eCBs as retrograde signal driving to t-LTD, as represented in B, [34,47] or NO retrograde signal driving to NMDAR-independent t-LTP, as represented in C [44]. In addition, astrocytes release D-serine for t-LTD at P13-P21 (B) and ATP/adenosine for t-LTP at P35-42 (C). The presence and involvement of astrocytic mGluRs in diverse forms of STDP should not be discarded and deserve further experimental efforts. Note that at hippocampal area CA1, a developmental switch occurs: when the postsynaptic activity precedes the presynaptic activity ($\Delta t < 0$) at P13-21, presynaptic t-LTD is induced (B) whereas presynaptic t-LTP is induced by the same protocol at older ages (P35-P42) (C) with astrocytes commanding the closing and opening of these plasticity windows [44,46]. Such general models represented in (A–C) are constantly evolving and, therefore, must be revisited considering future advances. (-): decrease in glutamate release in the presynaptic form of t-LTD, (+): pathways that are activated, (?): mechanistic insights that are yet to be demonstrated.

3. Group I mGluR Involvement in the Coincidence Detection for STDP

A mechanism for detection of the pre- and postsynaptic activities and their correlated timings appears crucial for codifying the spiking coincidence that drives STDP [30,33]. In a classical view, postsynaptic NMDARs are the receptors acting as coincidence detectors [5,6,30] (Figure 1A) and their contribution to STDP has been largely documented from either pre- or postsynaptic synaptic compartments [31,33,34,39,47–49]. However, presynaptically located NMDARs do not likely hold the role of coincidence detectors in NMDAR-dependent forms of STDP [55]. This evidence suggests the existence of different mechanisms of STDP that are mediated by different coincidence detectors [34,36,39,40,47,56–60] (Figure 1). Therefore, two different heterogeneous classes of STDP could be proposed: one class that involves NMDARs as the primary coincidence detectors [34,36,39,40,47,56–59] (Figure 1A) and another class that does not require NMDARs, or they do not codify the coincidence [34,39,40,44,46,47,60–63], and includes pre- or postsynaptic mGluRs (Figure 1B,C). Accordingly, irrespective of NMDAR involvement, as previously mentioned, it is known that STDP requires other players including mGluRs and retrograde messengers such as endocannabinoids (eCBs) or NO and involve astrocytes [34,39,40,44,46,47,60–63] (Figure 1B,C). Moreover, mGluRs could be proposed as relevant players in the coincidence detection mechanisms for STDP where NMDARs are not involved in such mechanisms.

In this regard, unlike ionotropic glutamate receptors, mGluRs are thought to operate within a larger timescale [6]. Thus, it turns out to be more intriguing how mGluRs can efficiently contribute as detectors of coincident activity that takes place in a time window of a few milliseconds (i.e., 5–10 ms) during few repetitive pairings (i.e., <100 times) as it happens for STDP [30,33]. However, even though GPCRs such as mGluRs are supposed to signal over a timescale of seconds to minutes, mGluR signaling has been suggested to also occur faster and with a timescale similar to that observed for ionotropic glutamate receptors [6]. This notion is supported by conformational studies showing large-scale, activation-associated mGluR1 inter-subunit changes on a millisecond timescale [64].

Consequently, most of the coincidence detector models propose mGluR-voltage-gated Ca^{2+} channel (VGCC)-IP₃R signaling as a principal postsynaptic coincidence detector. In addition, phospholipase C (PLC) and IP₃Rs have been proposed for serving well as molecular coincidence detectors. This pathway entails a strong Ca^{2+} dependence that can synergistically contribute to eCB signaling, thus driving some forms of t-LTD [30,47,65]. In fact, these models find support in several forms of STDP that depend on changes in the cytosolic Ca^{2+} dynamics involving Ca^{2+} influx through VGCCs and/or Ca^{2+} mobilization from internal stores [34,37,38,44,47,50,52,66–69] (Figure 1). Moreover, there is evidence that in the spine machinery, the release of Ca^{2+} from internal stores and Ca^{2+} transients through VGCCs are likely to provide highly localized and input-specific Ca^{2+} signals to induce synaptic plasticity [65,67].

Particularly, Ca^{2+} from VGCCs considerably facilitates mGluR-dependent PLC activation, acting independently as a co-agonist of IP₃Rs to promote IP₃-dependent Ca^{2+} release [70]. Thus, in this model, a Ca^{2+} influx through VGCCs during each postsynaptic action potential (spike) could transiently trigger mGluR-IP₃ signaling [67,71,72]. This could provide an adequate timing for the presynaptic spiking to drive mGluR signaling and release enough Ca^{2+} to trigger Ca^{2+} -dependent eCB synthesis and release that ultimately leads to LTD. A similar mechanism has been proposed for short-term synaptic depression with the involvement of VGCCs and mGluR I activation that synergistically drives eCB release [70,73]. This model appears essentially the same as the two-coincidence detector model for STDP that was previously proposed by Karmarkar and Buonomano (2002). Additionally, small increases of IP₃, which are not sufficient to stimulate release directly, can enhance the Ca^{2+} sensitivity of the IP₃Rs, thereby transforming the cytoplasm into an excitable medium able to produce Ca^{2+} waves [65,74]. For example, inhibiting the hydrolysis of IP₃ greatly enhances the sensitivity of neurons to synaptic stimulation [65].

As indicated above, mGluR I also mediates a form of cortical t-LTD that is independent of postsynaptic NMDARs and is presynaptically expressed [47]. This form of t-LTD, induced at layer 4 to layer 2/3 synapses in the primary somatosensory cortex, involves postsynaptic mGluRs and retrograde eCB signaling, suggesting a common signaling motif that is in line with the proposed roles of mGluR I in the models of coincidence detection. More recently, in the hippocampus, a presynaptic form of hippocampal t-LTD shows similar properties to that previously described in the neocortical synapses during development (12–18 postnatal days). This form of t-LTD is presynaptic, requires postsynaptic mGluR5, eCB type 1 receptors (CB₁R), postsynaptic Ca²⁺, astrocytic signaling (D-serine release) and non-postsynaptic NMDA receptors at Schaffer collateral-CA1 synapses [34]. Hence, the described mechanism matches with the above-mentioned class of STDP (Figure 1A).

Notably, this form of hippocampal t-LTD switches from depression to potentiation (t-LTP) across a wide range of spike timings as young mice mature towards the fifth postnatal week [44]. Interestingly, this form of t-LTP is also expressed presynaptically and requires the activation of mGluR5, but not NMDARs. In addition, the required activation of mGluR5 appears to reside presynaptically. At these synapses, presynaptic mGluRs have been described to bidirectionally modulate glutamate release [75]. Moreover, glial cells are also thought to express mGluRs that probably contribute to the influence of synaptic plasticity [76,77]. In turn, mGluRs located in the astrocytes appeared not to be involved in this particular form of t-LTP.

4. Concluding Remarks

Cooperative and correlated activity within neuronal circuits underlie information processing through the formation of neuronal network ensembles and short- and long-lasting plastic changes that are associated with and/or underlie higher cognitive processes such as memory formation and recall [13,78,79]. In the case of STDP, cumulative evidence suggests that either pre- or postsynaptic mGluR I may drive t-LTP and t-LTD, acting as a key component of non-classical postsynaptic NMDAR-based detection of activity coincidence. Thus, group I mGluRs have emerged as potent modulators/drivers of significant aspects of neuronal circuit functioning including STDP. Additionally, growing evidence posits mGluRs as suitable drug targets to treat neurological disorders such as anxiety, Parkinson’s disease, autism spectrum disorders, Alzheimer’s disease, fragile X syndrome and drug abuse [4,29,80,81] where STDP has been or could be found impaired. However, despite the great advances in studying the functional role of mGluRs in neuronal circuits and, in particular, in STDP, more research is needed to cover missing mechanistic insights that probably depend on the current experimental and technical limitations. In this regard, a direct demonstration of the functional presence of mGluRs at the presynaptic compartment could be achieved by paired recordings of connected pyramidal neurons while blocking the metabotropic signaling just in the presynaptic neuron, as it was previously performed to demonstrate the functional presence of NMDARs driving t-LTD in layer 4–layer 2/3 of the mouse barrel cortex [39,56]. As well, the occurrence of t-LTD and t-LTP at the same synapse involving presynaptic NMDARs, mGluRs and mGluRs located in the astrocytes could be unveiled by performing the above-mentioned arduous approach. Development of caged mGluR I antagonists that could be uncaged locally would allow for specific determinations of mGluR involvement in STDP at cellular and subcellular compartments.

Author Contributions: Conceptualization, A.R.-M. and Y.A.-T.; writing—original draft preparation, I.M.-G., A.R.-M. and Y.A.-T.; writing—review and editing, A.R.-M. and Y.A.-T.; supervision, A.R.-M. and Y.A.-T.; project administration, A.R.-M.; funding acquisition, A.R.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Regional Government of Andalusia and FEDER, grant number P2000881 and Agencia Estatal de Investigación/FEDER, grant number PID2019-107677GB-I00.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bodzeta, A.; Scheefhals, N.; MacGillavry, H.D. Membrane trafficking and positioning of mGluRs at presynaptic and postsynaptic sites of excitatory synapses. *Neuropharmacology* **2021**, *200*, 108799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nakanishi, S. Molecular Diversity of Glutamate Receptors and Implications for Brain Function. *Science* **1992**, *258*, 597–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kroon, T.; Dawitz, J.; Kramvis, I.; Anink, J.; Obermayer, J.; Verhoog, M.B.; Wilbers, R.; Goriounova, N.A.; Idema, S.; Baayen, J.C.; et al. Group I mGluR-mediated activation of martinotti cells inhibits local cortical circuitry in human cortex. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Niswender, C.M.; Conn, P.J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 295–322. [[CrossRef](#)]
5. Collingridge, G.L.; Abraham, W.C. Glutamate receptors and synaptic plasticity: The impact of Evans and Watkins. *Neuropharmacology* **2021**, *206*, 108922. [[CrossRef](#)]
6. Reiner, A.; Levitz, J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron* **2018**, *98*, 1080–1098. [[CrossRef](#)]
7. Mateos-Aparicio, P.; Rodríguez-Moreno, A. The Impact of Studying Brain Plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 66. [[CrossRef](#)]
8. Dolphin, A.C.; Errington, M.L.; Bliss, T.V. Long-term potentiation of the perforant path in vivo is associated with increased glutamate release. *Nature* **1982**, *297*, 496–498. [[CrossRef](#)]
9. Bliss, T.V.P.; Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **1993**, *361*, 31–39. [[CrossRef](#)]
10. Bi, G.; Poo, M. Synaptic Modifications in Cultured Hippocampal Neurons: Dependence on Spike Timing, Synaptic Strength, and Postsynaptic Cell Type. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 10464–10472. [[CrossRef](#)]
11. Malenka, R.C.; Bear, M.F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **2004**, *44*, 5–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Neves, G.; Cooke, S.F.; Bliss, T.V.P. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, *9*, 65–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Andrade-Talavera, Y.; Rodríguez-Moreno, A. Synaptic Plasticity and Oscillations in Alzheimer’s Disease: A Complex Picture of a Multifaceted Disease. *Front. Mol. Neurosci.* **2021**, *14*, 696476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Park, P.; Kang, H.; Sanderson, T.M.; Bortolotto, Z.A.; Georgiou, J.; Zhuo, M.; Kaang, B.K.; Collingridge, G.L. The Role of Calcium-Permeable AMPARs in Long-Term Potentiation at Principal Neurons in the Rodent Hippocampus. *Front. Synaptic Neurosci.* **2018**, *10*, 1–11. [[CrossRef](#)]
15. Bashir, Z.I.; Bortolotto, Z.A.; Davies, C.H.; Berretta, N.; Irving, A.J.; Seal, A.J.; Henley, J.M.; Jane, D.E.; Watkins, J.C.; Collingridge, G.L. Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* **1993**, *363*, 347–350. [[CrossRef](#)]
16. Bortolotto, Z.A.; Bashir, Z.I.; Davies, C.H.; Collingridge, G.L. A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. *Nature* **1994**, *368*, 740–743. [[CrossRef](#)]
17. Tigaret, C.M.; Chamberlain, S.E.L.; Sadowski, J.H.L.P.; Hall, J.; Ashby, M.C.; Mellor, J.R. Convergent Metabotropic Signaling Pathways Inhibit SK Channels to Promote Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 9252–9262. [[CrossRef](#)]
18. Kobayashi, K.; Manabe, T.; Takahashi, T. Presynaptic Long-Term Depression at the Hippocampal Mossy Fiber—CA3 Synapse. *Science* **1996**, *273*, 648–650. [[CrossRef](#)]
19. Negrete-Díaz, J.V.; Sihra, T.S.; Delgado-García, J.M.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition converges with presynaptic inhibition mediated by Group II mGluRs and long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *J. Neural Transm.* **2007**, *114*, 1425–1431. [[CrossRef](#)]
20. Lyon, L.; Borel, M.; Carrión, M.; Kew, J.N.C.; Corti, C.; Harrison, P.J.; Burnet, P.W.J.; Paulsen, O.; Rodríguez-Moreno, A. Hippocampal mossy fiber long-term depression in Grm2/3 double knockout mice. *Synapse* **2011**, *65*, 945–954. [[CrossRef](#)]
21. Mercier, M.S.; Lodge, D. Group III metabotropic glutamate receptors: pharmacology, physiology and therapeutic potential. *Neurochem. Res.* **2014**, *39*, 1876–1894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Dasgupta, A.; Lim, Y.J.; Kumar, K.; Baby, N.; Pang, K.L.K.; Benoy, A.; Behnisch, T.; Sajikumar, S. Group III metabotropic glutamate receptors gate long-term potentiation and synaptic tagging/capture in rat hippocampal area CA2. *Elife* **2020**, *9*, e55344. [[CrossRef](#)]
23. Lüscher, C.; Huber, K.M. Group 1 mGluR-Dependent Synaptic Long-Term Depression: Mechanisms and Implications for Circuitry and Disease. *Neuron* **2010**, *65*, 445–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sherman, S.M. The function of metabotropic glutamate receptors in thalamus and cortex. *Neuroscientist* **2014**, *20*, 136–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, X.F.; Daw, N.W. Metabotropic glutamate receptors potentiate responses to NMDA and AMPA from layer V cells in rat visual cortex. *J. Neurophysiol.* **1996**, *76*, 808–815. [[CrossRef](#)]
26. Mannaioli, G.; Marino, M.J.; Valenti, O.; Traynelis, S.F.; Conn, P.J. Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 5925–5934. [[CrossRef](#)]

27. Guérineau, N.C.; Bossu, J.L.; Gähwiler, B.H.; Gerber, U. Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 4395–4407. [[CrossRef](#)]
28. Guérineau, N.C.; Gähwiler, B.H.; Gerber, U. Reduction of resting K⁺ current by metabotropic glutamate and muscarinic receptors in rat CA3 cells: mediation by G-proteins. *J. Physiol.* **1994**, *474*, 27–33. [[CrossRef](#)]
29. Jones, O.D. Do group I metabotropic glutamate receptors mediate LTD? *Neurobiol. Learn. Mem.* **2017**, *138*, 85–97. [[CrossRef](#)]
30. Feldman, D.E. The Spike-Timing Dependence of Plasticity. *Neuron* **2012**, *75*, 556–571. [[CrossRef](#)]
31. Corlew, R.; Brasier, D.J.; Feldman, D.E.; Philpot, B.D. Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *Neuroscientist* **2008**, *14*, 609–625. [[CrossRef](#)]
32. Rodriguez-Moreno, A.; Banerjee, A.; Paulsen, O. Presynaptic NMDA Receptors and Spike Timing-Dependent Depression at Cortical Synapses. *Front. Synaptic Neurosci.* **2010**, *2*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Markram, H.; Gerstner, W.; Sjöström, P.J. Spike-Timing-Dependent Plasticity: A Comprehensive Overview. *Front. Synaptic Neurosci.* **2012**, *4*, 2010–2012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Andrade-Talavera, Y.; Duque-Feria, P.; Paulsen, O.; Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic Spike Timing-Dependent Long-Term Depression in the Mouse Hippocampus. *Cereb. Cortex* **2016**, *26*, 3637–3654. [[CrossRef](#)]
35. Min, R.; Nevian, T. Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 746–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Banerjee, A.; González-Rueda, A.; Sampaio-Baptista, C.; Paulsen, O.; Rodríguez-Moreno, A. Distinct mechanisms of spike timing-dependent LTD at vertical and horizontal inputs onto L2/3 pyramidal neurons in mouse barrel cortex. *Physiol. Rep.* **2014**, *2*, e00271. [[CrossRef](#)]
37. Fino, E.; Paille, V.; Cui, Y.; Morera-Herreras, T.; Deniau, J.-M.; Venance, L. Distinct coincidence detectors govern the corticostriatal spike timing-dependent plasticity. *J. Physiol.* **2010**, *588*, 3045–3062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Sgritta, M.; Locatelli, F.; Soda, T.; Prestori, F.; D’Angelo, E.U. Hebbian Spike-Timing Dependent Plasticity at the Cerebellar Input Stage. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 2809–2823. [[CrossRef](#)]
39. Banerjee, A.; Meredith, R.M.; Rodríguez-Moreno, A.; Mierau, S.B.; Auberson, Y.P.; Paulsen, O. Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunit-preferring NMDA receptor antagonists in mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex* **2009**, *19*, 2959–2969. [[CrossRef](#)]
40. Duguid, I.; Sjöström, P.J. Novel presynaptic mechanisms for coincidence detection in synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2006**, *16*, 312–322. [[CrossRef](#)]
41. Kwag, J.; Paulsen, O. The timing of external input controls the sign of plasticity at local synapses. *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 1219–1221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Brzsko, Z.; Schultz, W.; Paulsen, O. Retroactive modulation of spike timing-dependent plasticity by dopamine. *Elife* **2015**, *4*, e09685. [[CrossRef](#)]
43. Brzsko, Z.; Mierau, S.B.; Paulsen, O. Neuromodulation of Spike-Timing-Dependent Plasticity: Past, Present, and Future. *Neuron* **2019**, *103*, 563–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Falcón-Moya, R.; Pérez-Rodríguez, M.; Prius-Mengual, J.; Andrade-Talavera, Y.; Arroyo-García, L.E.; Pérez-Artés, R.; Mateos-Aparicio, P.; Guerra-Gomes, S.; Oliveira, J.F.; Flores, G.; et al. Astrocyte-mediated switch in spike timing-dependent plasticity during hippocampal development. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Martínez-Gallego, I.; Pérez-Rodríguez, M.; Coatl-Cuaya, H.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Adenosine and astrocytes determine the developmental dynamics of spike timing-dependent plasticity in the somatosensory cortex. *J. Neurosci.* **2022**. *ahead of print*. [[CrossRef](#)]
46. Pérez-Rodríguez, M.; Arroyo-García, L.E.; Prius-Mengual, J.; Andrade-Talavera, Y.; Armengol, J.A.; Pérez-Villegas, E.M.; Duque-Feria, P.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Adenosine Receptor-Mediated Developmental Loss of Spike Timing-Dependent Depression in the Hippocampus. *Cereb. Cortex* **2019**, *29*, 3266–3281. [[CrossRef](#)]
47. Bender, V.A.; Bender, K.J.; Brasier, D.J.; Feldman, D.E. Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 4166–4177. [[CrossRef](#)]
48. Brasier, D.J.; Feldman, D.E. Synapse-Specific Expression of Functional Presynaptic NMDA Receptors in Rat Somatosensory Cortex. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 2199–2211. [[CrossRef](#)]
49. Rodríguez-Moreno, A.; Paulsen, O. Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 744–745. [[CrossRef](#)]
50. Jung, S.J.; Kim, S.J.; Park, Y.K.; Oh, S.B.; Cho, K.; Kim, J. Group I mGluR regulates the polarity of spike-timing dependent plasticity in substantia gelatinosa neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *347*, 509–516. [[CrossRef](#)]
51. Jung, S.-Y.; Kim, J.; Kwon, O. Bin; Jung, J.H.; An, K.; Jeong, A.Y.; Lee, C.J.; Choi, Y.-B.; Bailey, C.H.; Kandel, E.R.; et al. Input-specific synaptic plasticity in the amygdala is regulated by neuroligin-1 via postsynaptic NMDA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4710–4715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lu, J.T.; Li, C.Y.; Zhao, J.P.; Poo, M.M.; Zhang, X.H. Spike-timing-dependent plasticity of neocortical excitatory synapses on inhibitory interneurons depends on target cell type. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 9711–9720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Shipman, M.L.; Madasu, S.C.; Morielli, A.D.; Green, J.T. Intracerebellar infusion of an mGluR1/5 agonist enhances eyeblink conditioning. *Behav. Neurosci.* **2021**, *135*, 336–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Kwag, J.; Paulsen, O. Gating of NMDA receptor-mediated hippocampal spike timing-dependent potentiation by mGluR5. *Neuropharmacology* **2012**, *63*, 701–709. [CrossRef] [PubMed]
55. Wong, H.H.W.; Rannio, S.; Jones, V.; Thomazeau, A.; Sjöström, P.J. NMDA receptors in axons: There's no coincidence. *J. Physiol.* **2021**, *599*, 367–387. [CrossRef]
56. Bi, G.-Q.; Rubin, J. Timing in synaptic plasticity: from detection to integration. *Trends Neurosci.* **2005**, *28*, 222–228. [CrossRef] [PubMed]
57. Froemke, R.C.; Poo, M.-M.; Dan, Y. Spike-timing-dependent synaptic plasticity depends on dendritic location. *Nature* **2005**, *434*, 221–225. [CrossRef]
58. Nishiyama, M.; Hong, K.; Mikoshiba, K.; Poo, M.M.; Kato, K. Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* **2000**, *408*, 584–588. [CrossRef]
59. Shouval, H.Z.; Bear, M.F.; Cooper, L.N. A unified model of NMDA receptor-dependent bidirectional synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10831–10836. [CrossRef]
60. Rodríguez-Moreno, A.; Kohl, M.M.; Reeve, J.E.; Eaton, T.R.; Collins, H.A.; Anderson, H.L.; Paulsen, O.; Rodríguez-Moreno, A.; Kohl, M.M.; Reeve, J.E.; et al. Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 8564–8569. [CrossRef]
61. Egger, V.; Feldmeyer, D.; Sakmann, B. Coincidence detection and changes of synaptic efficacy in spiny stellate neurons in rat barrel cortex. *Nat. Neurosci.* **1999**, *2*, 1098–1105. [CrossRef] [PubMed]
62. Bouvier, G.; Larsen, R.S.; Rodríguez-Moreno, A.; Paulsen, O.; Sjöström, P.J. Towards resolving the presynaptic NMDA receptor debate. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2018**, *51*, 1–7. [CrossRef]
63. Pérez-Otaño, I.; Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic NMDARs and astrocytes ally to control circuit-specific information flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 13166–13168. [CrossRef] [PubMed]
64. Hlavackova, V.; Zabel, U.; Frankova, D.; Bätz, J.; Hoffmann, C.; Prezeau, L.; Pin, J.-P.; Blahos, J.; Lohse, M.J. Sequential inter- and intrasubunit rearrangements during activation of dimeric metabotropic glutamate receptor 1. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, ra59. [CrossRef] [PubMed]
65. Berridge, M.J. Neuronal calcium signaling. *Neuron* **1998**, *21*, 13–26. [CrossRef]
66. Inglebert, Y.; Debanne, D. Calcium and Spike Timing-Dependent Plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, *15*, 727336. [CrossRef]
67. Nevian, T.; Sakmann, B. Spine Ca^{2+} Signaling in Spike-Timing-Dependent Plasticity. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 11001–11013. [CrossRef]
68. Mateos-Aparicio, P.; Rodríguez-Moreno, A. Calcium Dynamics and Synaptic Plasticity. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer: Cham, Switzerland, 2020; pp. 965–984. ISBN 978-3-030-12457-1.
69. Cepeda-Prado, E.A.; Khodaie, B.; Quiceno, G.D.; Beythien, S.; Edelmann, E.; Lessmann, V. Calcium-Permeable AMPA Receptors Mediate Timing-Dependent LTP Elicited by Low Repeat Coincident Pre- and Postsynaptic Activity at Schaffer Collateral-CA1 Synapses. *Cereb. Cortex* **2021**, *32*, 1682–1703. [CrossRef]
70. Hashimoto, Y.; Ohno-Shosaku, T.; Tsubokawa, H.; Ogata, H.; Emoto, K.; Maejima, T.; Araishi, K.; Shin, H.-S.; Kano, M. Phospholipase C β serves as a coincidence detector through its Ca^{2+} dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* **2005**, *45*, 257–268. [CrossRef]
71. Sabatini, B.L.; Maravall, M.; Svoboda, K. $\text{Ca}(2+)$ signaling in dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, *11*, 349–356. [CrossRef]
72. Bloodgood, B.L.; Sabatini, B.L. $\text{Ca}(2+)$ signaling in dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2007**, *17*, 345–351. [CrossRef] [PubMed]
73. Kreitzer, A.C.; Malenka, R.C. Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 10537–10545. [CrossRef] [PubMed]
74. Lorenzon, P.; Zucchetti, D.; Codazzi, F.; Fumagalli, G.; Meldolesi, J.; Grohovaz, F. Ca^{2+} waves in PC12 neurites: a bidirectional, receptor-oriented form of Ca^{2+} signaling. *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 797–804. [CrossRef] [PubMed]
75. Rodríguez-Moreno, A.; Sistiaga, A.; Lerma, J.; Sánchez-Prieto, J. Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization. *Neuron* **1998**, *21*, 1477–1486. [CrossRef]
76. Porter, J.T.; McCarthy, K.D. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 5073–5081. [CrossRef]
77. Perea, G.; Araque, A. Astrocytes Potentiate Transmitter Release at Single Hippocampal Synapses. *Science* **2007**, *317*, 1083–1086. [CrossRef]
78. Buzsáki, G.; Draguhn, A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* **2004**, *304*, 1926–1929. [CrossRef]
79. McBain, C.J.; Fisahn, A. Interneurons unbound. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 11–23. [CrossRef]
80. Gray, E.E.; Murphy, J.G.; Liu, Y.; Trang, I.; Tabor, G.T.; Lin, L.; Hoffman, D.A. Disruption of GpI mGluR-Dependent Cav2.3 Translation in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *J. Neurosci.* **2019**, *39*, 7453–7464. [CrossRef]
81. Crupi, R.; Impellizzeri, D.; Cuzzocrea, S. Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *12*, 20. [CrossRef]

